

Université de Montréal

**THÉRAPIE PAR LES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES DANS LA GUÉRISON
TENDINEUSE CHEZ LE CHEVAL**

par

Céline BOURZAC, DMV, IPSAV

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
maître ès Sciences (M.Sc)
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

Août 2009

© Céline Bourzac, 2009

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**THÉRAPIE PAR LES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES DANS LA GUÉRISON
TENDINEUSE CHEZ LE CHEVAL**

présenté par

Céline BOURZAC, DMV, IPSAV

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Bruce C. Murphy, président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

Lawrence C. Smith, membre du jury

Résumé

Les tendinites sont des lésions communes chez le cheval athlète, ayant un impact financier et sportif considérable. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de moelle osseuse (MO) sont empiriquement utilisées en clinique pour améliorer la guérison des affections myoarthrosquelettiques. Cependant, il est nécessaire de standardiser les protocoles d'isolement des CSMs équine et d'analyser leurs effets sur la guérison tendineuse pour ajuster leur dose. Les objectifs de cette étude étaient de comparer 3 méthodes d'isolement des CSMs équine et d'établir un modèle de guérison tendineuse minimal invasif pour analyser l'effet des CSMs sur cette guérison.

Des CSMs de MO du sternum de juments étaient isolées par 3 protocoles couramment utilisés (adhérence au pétri (Classique) et 2 méthodes par gradient de densité (Percoll et Ficoll)). La viabilité des cellules après isolement, le rendement d'isolement, le nombre de CSMs obtenues après 14 jours de culture et leurs caractéristiques fonctionnelles (renouvellement et différenciation) étaient comparés entre les 3 protocoles. Les résultats suggéraient que le Percoll était le meilleur protocole en termes de rendement et de capacité de renouvellement des cellules. La différence n'était pas significative pour leur viabilité et leur capacité de différenciation.

Un modèle de guérison tendineuse, consistant en une ténectomie du tendon extenseur latéral du doigt fut ensuite développé. Cependant, la grande variabilité interindividuelle de qualité de guérison dans le groupe pilote implique une ré-évaluation du modèle.

Des études futures, avec des CSMs isolées par le Percoll dans de nouveaux modèles de guérison tendineuse devraient permettre de déterminer la dose adéquate de CSMs.

Mots-clés : Cheval, Guérison tendineuse, Cellules souches mésenchymateuses, Protocole d'isolement, Percoll, Ficoll

Abstract

In equine athletes, tendinitis lesions are common and lead to substantial financial losses. Bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs) are employed clinically empirically to enhance healing of musculoskeletal injuries. However, there is a need to standardize equine MSC isolation protocols, to analyze the effects of MSCs on tendon healing and to optimize dosage. The objectives of the study were to compare 3 methods of equine MSC isolation and develop a minimally invasive model of tendon healing to analyze the effects of MSCs on tendon healing.

BM MSCs from the sternum of mares were isolated by 3 protocols (adherence to a plastic culture dish (Classic) and two gradient density separation protocols (Percoll and Ficoll)) to compare for cell viability, MSC yield, number of MSCs attained after 14 days of culture and functional characteristics (self-renewal and multilineage differentiation) of the MSCs. The results suggested that the Percoll protocol was the best of those assessed in terms of MSC yield and self-renewal potential and that MSCs retrieved with the Ficoll protocol had the lowest self-renewal. There were no significant differences in terms of cell viability and differentiation capacity.

A tendon healing model was then developed and consisted of a 0.5 cm tenectomy of the lateral digital extensor tendon. However, interanimal variation of healing quality was so high within the pilot group that the model should be re-evaluated.

Further studies using MSCs isolated with Percoll in other novel models of tendon healing would allow determination of the adequate dosage of MSCs.

Keywords: Horse, Tendon healing, Mesenchymal stem cell, Isolation protocol, Percoll, Ficoll

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et des abréviations	xii
Remerciements.....	xvii

Introduction..... 1

Chapitre 1 : Recension de littérature 3

1.1 Première partie : Le tendon 3

1.1.1 Anatomie et histologie du tendon	3
1.1.1.1 Le tendon et ses annexes	3
1.1.1.2 Vascularisation	5
1.1.1.3 Innervation	6
1.1.2 Ultrastructure du tendon	6
1.1.2.1 Les cellules.....	6
1.1.2.2 La matrice extracellulaire.....	7
1.1.3 Métabolisme.....	9
1.1.4 Organisation structurale et propriétés biomécaniques du tendon	10

1.2 Deuxième partie : Physiologie de la guérison tendineuse..... 13

1.2.1 Méthodes d'étude de la guérison des tendons	13
1.2.1.1 Modèles expérimentaux	13
1.2.1.2 Méthodes d'évaluation	15
1.2.2 Étapes de la guérison tendineuse	17

1.3	Troisième partie : Les tendinites chez le Cheval	20
1.3.1	Définition	20
1.3.2	Pathophysiologie des tendinites chez le cheval	20
1.3.2.1	Théorie mécanique	20
1.3.2.2	Théorie thermique	22
1.3.2.3	Théorie de l'ischémie	23
1.3.2.4	Autres hypothèses	24
1.3.3	Traitements	24
1.4	Quatrième partie : Les cellules souches mésenchymateuses.26	
1.4.1	Définition et terminologie.....	26
1.4.2	Propriétés	28
1.4.2.1	Prolifération et différenciation	28
1.4.2.2	Plasticité et flexibilité/réversibilité.....	30
1.4.2.3	Effets autocrines et paracrines.....	30
1.4.3	Effets secondaires possibles.....	33
1.4.3.1	Transmission de maladie	33
1.4.3.2	Transformation maligne des cellules.....	33
1.4.3.3	Formations ectopiques.....	34
1.4.3.4	Immunogénicité.....	34
1.4.4	Prélèvement, isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses adultes.....	34
1.4.4.1	Prélèvement.....	34
1.4.4.2	Isolement.....	35
1.4.4.3	Caractérisation.....	40
1.4.5	Potentiel dans les affections tendineuses	43
1.4.6	Protocole pour thérapie	46
1.5	Hypothèses et objectifs	47
Chapitre 2	: Article	54
2.1	Abstract	50
2.2	Introduction	51

2.3	Materials and methods.....	54
2.3.1	Animals.....	54
2.3.2	BM harvest.....	54
2.3.3	MSC isolation	54
2.3.3.1	Classic protocol.....	54
2.3.3.2	Density Gradient separation (Percoll or Ficoll).....	54
2.3.4	Protocol MSC yield	55
2.3.5	Colony-Forming Unit (CFU) assays.....	55
2.3.6	Trilineage cell differentiation	55
2.3.6.1	Osteogenesis assay	56
2.3.6.2	Chondrogenesis assay	56
2.3.6.3	Adipogenesis assay	57
2.3.7	Statistical analysis.....	57
2.4	Results.....	59
2.4.1	MSC isolation	59
2.4.2	Protocol MSC yield	59
2.4.3	CFU assays	59
2.4.4	Trilineage differentiation	59
2.4.4.1	Osteogenic differentiation capacity	60
2.4.4.2	Chondrogenic differentiation capacity	60
2.4.4.3	Adipogenic differentiation capacity	60
2.5	Discussion	61
2.6	Footnote	64
2.7	Acknowledgements	64
2.8	References	65
2.9	Legends	71

Chapitre 3 : élaboration d'un modèle de guérison tendineuse (étude pilote).....	82
3.1 Introduction	82
3.2 Matériel et méthodes	82
3.2.1 Animaux.....	82

3.2.2	Procédure chirurgicale : induction d'un défaut tendineux.....	83
3.2.3	Suivi échographique de la guérison tendineuse.....	84
3.2.4	Prélèvement du tissu tendineux cicatriciel.....	84
3.2.5	Examen histologique.....	85
3.3	Résultats	85
3.3.1	Induction du défaut tendineux	85
3.3.2	Suivi échographique de la guérison tendineuse.....	85
3.3.3	Prélèvement du tissu cicatriciel	88
3.3.4	Examen histologique.....	88
3.4	Conclusion	89
3.5	Produits utilisés.....	89
	Chapitre 4 : discussion générale	90
4.1	Comparaison de protocoles d'isolement des cellules souches mésenchymateuses chez le cheval.....	90
4.2	Élaboration d'un modèle de guérison tendineuse chez le cheval.....	91
4.3	Limites et directions futures.....	92
	Conclusion	95
	Bibliographie	xviii

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I : Résumé des principaux traitements des tendinites chez le Cheval	25
Tableau II : Effets immunomodulateurs des cellules souches mésenchymateuses et cellules-cibles impliquées	32
Tableau III : Résumé des méthodes histologiques et d'expression génique permettant la démonstration de la différenciation des cellules souches en trois lignées	42
Tableau IV : Principaux résultats des études portant sur l'utilisation des cellules souches pour la guérison du tendon	44

Chapitre 2

Tableau I : Summary of equine mononuclear cell (MNC) and mesenchymal stem cell (MSC) yield and kinetics obtained from bone marrow samples with different isolation protocols	73
Tableau II : Global frequencies of CFU (%) at P0 and P1 for the Classic, Percoll and Ficoll protocols	74

Chapitre 3

Tableau I : Résumé des résultats de l'examen échographique	87
--	----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Structure du tendon intact sous lumière polarisée, à l'échelle microscopique.....	3
Figure 2 : Le tendon et ses annexes	4
Figure 3 : Vascularisation et innervation de la gaine.....	5
Figure 4 : Section longitudinale de tendon observée au microscope.....	6
Figure 5 : Microstructure générale d'une triple hélice de collagène avec sa séquence typique d'acides aminés dans les chaînes α	8
Figure 6 : Organisation hiérarchique du tendon.....	11
Figure 7 : Courbe de déformation du tendon en fonction de la tension.....	12
Figure 8 : Propriétés structurales (a) et mécaniques (b) d'un tendon	16
Figure 9 : Cycle d'allongement et de relâchement du tendon fléchisseur superficiel du doigt chez le Cheval	23
Figure 10 : Classification des différents types de cellules souches	27
Figure 11 : Diminution de la quantité de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse avec l'âge chez l'Homme.....	28
Figure 12 : Diagramme illustrant les capacités de différenciation des cellules souches mésenchymateuses	29
Figure 13 : Séparation des composants de la moelle osseuse après centrifugation sur gradient de densité.....	36
Figure 14 : Liste des marqueurs rapportés à ce jour permettant d'identifier les cellules souches mésenchymateuses.	38
Figure 15 : Séparation des cellules souches par le FACS.....	39
Figure 16 : Différenciation des cellules souches en fonction des facteurs utilisés dans le milieu de culture.....	41
Figure 17 : Lésion centrale de tendinite du tendon fléchisseur superficiel du doigt chez un Cheval	45

Chapitre 2

Figure 1:	75
Figure 2:	76
Figure 3:	77
Figure 4:	78
Figure 5:	80

Chapitre 3

Figure 1 : Modèle de guérison tendineuse : ténectomie du tendon extenseur latéral du doigt	83
Figure 2 : Un exemple de suivi échographique (coupe transversale) de la guérison tendineuse après ténectomie.....	86
Figure 3 : Tissu cicatriciel prélevé 7 semaines après la ténectomie chez les juments 1 (a), 2 (b) et 3 (c).....	88
Figure 4 : Section longitudinale de tendon normal (a, contrôle) et du tissu cicatriciel obtenu 7 semaines après la ténectomie (b).....	89

Liste des sigles et des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribo-Nucléique
AINS :	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AT :	Adipose Tissue (Tissu adipeux)
bFGF :	basic Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance basique des fibroblastes)
BM :	Bone Marrow (Moelle osseuse)
BMP :	Bone Morphogenic Protein (Protéine morphogénétique de l'os)
BMP-2 :	Bone Morphogenic Protein-2 (Protéine morphogénétique de l'os-2)
CFU(s) :	Colony Forming Unit(s) (Unité(s) de formation de colonies)
CFU(s)-f :	Colony Forming Unit(s)-fibroblastic (Unité(s) de formation de colonies fibroblastiques)
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH-I :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité-I
COMP :	Cartilage Oligomeric Matrix Protein (Protéine matricielle oligomérique du cartilage)
CPA :	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CS(s) :	Cellule(s) Souche(s)
CSM(s) :	Cellule(s) Souche(s) Mésenchymateuse(s)

FACS :	Fluorescence Activated Cell Sorting (Tri des cellules actives par fluorescence)
FDP :	Flexor Digitorum Profundus (Fléchisseur profond des doigts)
GAG(s) :	GlycosAminoGlycan(s) (Glycosaminiglycane(s))
G-CSF :	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes de macrophages)
HE :	Hématoxyline Éosine
HGF :	Hepatic Growth Factor (Facteur de croissance hépatocytaire)
HPS :	Hématoxyline Phloxine Safran
HLA :	Human Leucocyte Antigen (Antigène des leucocytes humains)
Ig :	Immunoglobuline
IgA :	Immunoglobuline A
IgG :	Immunoglobuline G
IgM :	Immunoglobuline M
IGF-1 :	Insulin-like Growth Factor (Facteur de croissance insulino-mimétique-1)

IL :	Interleukin (Interleukine)
IL-4 :	Interleukin-4 (Interleukine-4)
IL-6 :	Interleukin-6 (Interleukine-6)
IL-8 :	Interleukin-8 (Interleukine-8)
IL-10 :	Interleukin-10 (Interleukine-10)
IM :	Intramusculaire
INF γ :	Interféron γ
IV :	Intraveineuse
LTH :	Lymphocyte T Helper (Lymphocyte T Helper)
LTH-1 :	Lymphocyte T Helper-1 (Lymphocyte T Helper-1)
LTH-2 :	Lymphocyte T Helper-2 (Lymphocyte T Helper-2)
MACS :	Magnetic Activated Cell Sorting (Tri des cellules actives par magnétisation)
MCP-3 :	Monocyte Chemotactic Protein-3 (Protéine chimiotactique des monocytes-3)
MEC :	Matrice Extracellulaire
MMP(s) :	Matrix Metalloproteinase(s) (Métalloprotéinase(s) de la matrice)
MMP-2 :	Matrix Metalloproteinase-2 (Métalloprotéinase de la matrice-2)
MMP-3 :	Matrix Metalloproteinase-3 (Métalloprotéinase de la matrice-3)
MMP-9 :	Matrix Metalloproteinase-9 (Métalloprotéinase de la matrice-9)

MMP-13 :	Matrix Metalloproteinase-13 (Métalloprotéinase de la matrice-13)
MMP-14 :	Matrix Metalloproteinase-14 (Métalloprotéinase de la matrice-14)
MO :	Moelle Osseuse
MSC(s) :	Mesenchymal Stem Cell(s) (Cellules souches mésenchymateuses)
NK :	Natural Killer cells (Cellules tueuses naturelles)
PCR :	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PGE ₂ :	ProstaGlandine E ₂
PO :	Per Os
PPAR γ :	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (Récepteur γ activé de la prolifération des péroxysomes)
Stro-1 :	Facteur dérivé du Stroma-1
TFSD :	Tendon Fléchisseur Superficiel du Doigt
TGF- β_1 :	Transforming Growth Factor- β_1 (Facteur de croissance transformant β_1)
TIMP :	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase (Inhibiteur tissulaire de metalloproteinase)
TIMP-1 :	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1 (Inhibiteur tissulaire de metalloproteinase-1)
TIMP-2 :	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-2 (Inhibiteur tissulaire de metalloproteinase-2)

TMS :	TriMéthoprine Sulfaméthoxazole
TNF α :	Tumor Necrosis Factor α (Facteur de nécrose tumorale α)
VEGF :	Vascular Endothelium Growth Factor (Facteur de croissance endothéliale vasculaire)

Remerciements

À Dr Sheila Laverty, *directrice*

Pour votre encadrement dans ce projet et cette introduction dans le domaine de la recherche.

Pour votre enthousiasme, votre rigueur et votre disponibilité.

À Bruce D. Murphy, *président-rapporteur*

Pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation.

À Lawrence C. Smith, *membre du jury*

Pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation.

À Guy Beauchamp,

Pour son aide très précieuse dans le travail d'analyse statistique ainsi que pour tous ses conseils et explications.

À Hélène Richard, Nadine Bouchard, Kathleen, Pascal et Émilie

Pour votre aide précieuse, votre disponibilité, vos conseils ou trucs et astuces, et surtout votre bonne humeur ! Bonne chance pour la suite !

À ma famille et surtout mes parents

Pour votre amour et votre soutien.

Pour toujours croire en moi et être derrière moi quoique j'entreprenne.

Introduction

Le tendon est un tissu conjonctif dense, hautement organisé, qui relie un muscle à un os. Il participe, avec les ligaments, au mouvement et à la stabilité des articulations (Woo *et al.* 1999a). C'est une structure compliant, c'est-à-dire possédant une capacité importante mais limitée à s'étirer : ainsi, il est relativement inextensible, ce qui permet la conversion de la contraction musculaire en mouvement au niveau des articulations, mais il emmagasine également de l'énergie lors de son étirement. Une partie de cette énergie est restituée quand le tendon revient à son état initial, améliorant ainsi l'efficacité du mouvement et diminuant son coût énergétique (Benjamin and Ralphs 1997; Goodship *et al.* 1994).

Le tendon est une structure hypocellulaire et hypovasculaire (Benjamin and Ralphs 1997). Aussi, lors de lésion, la guérison est lente. Les fibres tendineuses sont réparées par du tissu fibreux qui ne présente pas les propriétés structurales et fonctionnelles du tendon normal original : le tissu cicatriciel est moins élastique et moins résistant que le tissu normal. Le risque de récurrence lésionnelle est alors augmenté (Pool 1996).

Chez le cheval, les tendinites sont des lésions tendineuses très communes, notamment chez les chevaux courant à haute vitesse ; le Thoroughbred de course est particulièrement affecté avec des incidences de la tendinite du tendon fléchisseur superficiel du doigt (TFSD) allant de 8 à 43 % (Dowling *et al.* 2000; Kasashima *et al.* 2004; Rooney and Genovese 1981). Les tendinites se traduisent par de l'inconfort ou de la boiterie, ainsi que par de l'enflure en regard du tendon lésé. L'incapacité qu'elles provoquent, par la nécessité d'une mise au repos prolongée, peut durer plusieurs mois (Goodship *et al.* 1994; Sharma and Maffulli 2005). L'impact financier est considérable en raison de la répercussion de ces lésions sur les performances du cheval et de leur fort taux de récurrence (estimé à 56 % (Dyson 2004)). La carrière sportive de l'animal est même généralement fortement compromise et peut se solder par l'euthanasie du cheval.

Le traitement de ces affections constituent donc un véritable défi pour le vétérinaire, d'autant plus que les traitements actuels tels que le repos, la desmotomie de la bride radiale, les ondes de choc (Shock wave)... n'apportent pas encore entière satisfaction. En effet, il y a peu de preuves de leur efficacité comparativement à une période de repos prolongée et à de l'exercice contrôlé (Dowling *et al.* 2000). Idéalement, les nouveaux traitements devraient viser la régénération du tendon et, en ce sens, l'utilisation des cellules souches

semble être une voie encourageante (Hildebrand *et al.* 2002; Woo *et al.* 1999b; Young *et al.* 1998). En fait, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont la base de l'homéostasie tissulaire, car elles sont impliquées dans le renouvellement des tissus et dans leur réparation lorsqu'ils sont lésés. Implantées en grand nombre dans un tissu où elles sont déjà présentes en temps normal mais en faible quantité, elles auraient la capacité de régénérer les tissus sans la production d'un tissu cicatriciel, qui est habituellement le résultat du processus de guérison. Chez le Cheval, elles sont couramment utilisées en clinique mais de façon empirique dans le traitement des affections myoarthrosquelettiques. Cependant, à ce jour, relativement peu d'information a été rapportée sur ces cellules dans cette espèce, que ce soit en termes d'efficacité ou de techniques d'isolement. D'ailleurs, cette information est souvent extrapolée des connaissances acquises dans d'autres espèces comme l'Homme, la Souris ou le Rat.

L'objet de notre étude est donc, dans un premier temps, de déterminer un protocole d'isolement des CSMs le plus adéquat dans l'espèce équine pour la thérapie cellulaire, et dans un deuxième temps d'élaborer un modèle de guérison tendineuse minimal invasif afin d'analyser l'influence de l'implantation des CSMs sur cette guérison.

Chapitre 1 : Recension de littérature

1.1 Première partie : Le tendon

1.1.1 Anatomie et histologie du tendon

1.1.1.1 Le tendon et ses annexes

Un tendon sain apparaît blanc et brillant à l'examen macroscopique. Sa forme et sa longueur varient grandement en fonction de sa localisation : il peut être long, rond, court ou aplati. Au microscope, sous lumière à faible angle d'incidence, on observe une alternance de bandes sombres et de bandes claires révélant une surface ondulée caractéristique ou « crimp » (figure 1). Cette ondulation est liée à l'organisation des fibres de collagène (Goodship *et al.* 1994) et se retrouve également à l'échelle de la fibrille de collagène.

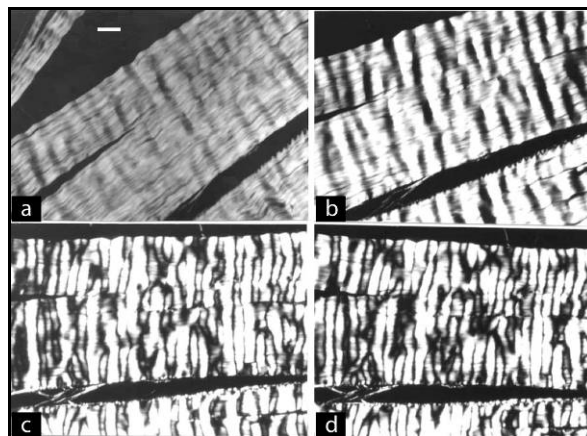


Figure 1 : Structure du tendon intact sous lumière polarisée, à l'échelle microscopique
(de Campos Vidal 2003)

Observation des fibres de sous différents angles relativement au polariseur : a) 45° ; b) 20° ; c) 0° ; d) -1°
Échelle : barre = 100 μ m

Le tendon est une structure fibroélastique composée de cordes de tissu conjonctif paquetées entre elles, arrangées parallèlement à l'axe longitudinal du tendon et s'étendant sur toute sa longueur (Kirkendall and Garrett 1997). L'union du tendon au muscle constitue la jonction musculotendineuse, tandis que celle du tendon à l'os constitue la jonction ostéotendineuse (Kannus 2000). La jonction musculotendineuse est la zone la plus fragile du tendon (Hayem 2001).

Cinq structures peuvent accompagner le tendon en fonction de sa localisation (Kannus 2000) (figure 2) :

- le paratendon est une gaine péritendineuse constituée d'un tissu conjonctif lâche permettant de réduire les frictions lors du mouvement,
- les gaines synoviales forment un canal fermé contenant du liquide synovial et assurant le glissement et la lubrification du tendon. Elles sont situées dans les régions où le tendon est soumis à des forces plus importantes (Sharma and Maffulli 2006).

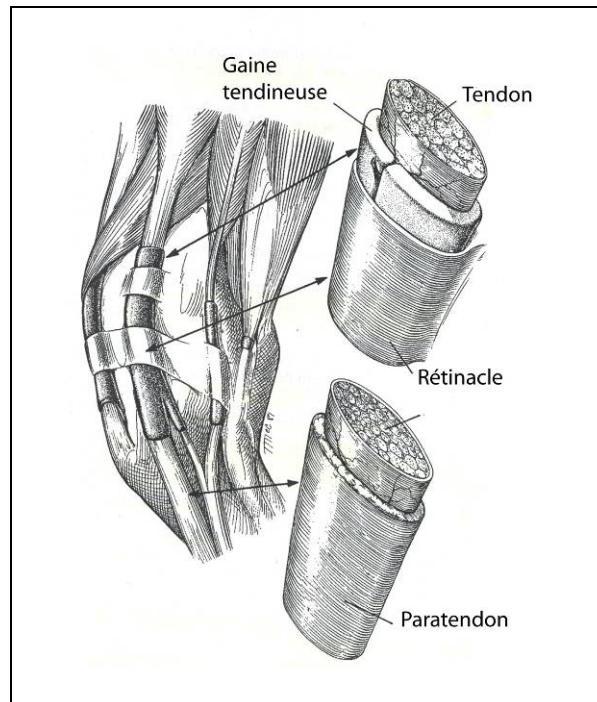


Figure 2 : Le tendon et ses annexes

(McIlwraith 2002)

Le paratendon est principalement constitué de collagène de types I et III et de fibrilles élastiques (Kannus 2000). Sous le paratendon se trouve une deuxième gaine de tissu conjonctif qui entoure le tendon appelée épitendon. Sa face externe est contiguë au paratendon et sa face interne à l'endotendon. Ses fibrilles de collagène sont orientées dans les plans longitudinal, transverse et oblique. Le paratendon et l'épitendon forment le péritendon (Kirkendall and Garrett 1997).

L'endotendon est un tissu conjonctif qui sépare les fibres tendineuses, en continuité à la fois avec le périmysium et le périoste. Il permet aux groupes de fibres de glisser les uns

par rapport aux autres (Benjamin and Ralphs 1997) et transporte les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les nerfs jusque dans les parties profondes du tendon.

1.1.1.2 Vascularisation

Le tendon est une structure relativement bien vascularisée, comparativement au cartilage articulaire, mais il l'est beaucoup moins que le muscle (Kirkendall and Garrett 1997), l'os et la membrane synoviale (Benjamin and Ralphs 1997). La vascularisation provient de deux systèmes principaux : le système intrinsèque constitué par les vaisseaux du pérимysium à la jonction musculotendineuse et du périoste à la jonction ostéotendineuse, et le système extrinsèque constitué par le paratendon et les bourses synoviales (Sharma and Maffulli 2005) (figure 3). L'importance relative des deux types de système varie d'un tendon à l'autre (Sharma and Maffulli 2006).

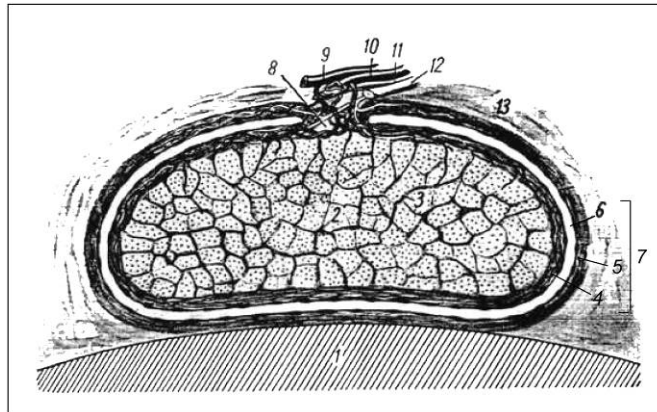


Figure 3 : Vascularisation et innervation de la gaine

(<http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/veterin/vet67/images/gross/ms-gross/ms008.jpg>)

1= surface osseuse, 2= fibres tendineuses, 3= pérítendon, 4= feuillet viscéral, 5= feuillet pariétal, 6= liquide synovial, 7= gaine tendineuse, 8= mésotendon, 9= artère, 10= veine, 11= vaisseau lymphatique, 12= nerf, 13 = tissu conjonctif lâche.

Ainsi, les sites d'insertion reçoivent le meilleur approvisionnement en sang, par le système intrinsèque, comparés au corps tendineux (Hayem 2001). En effet, les vaisseaux issus du muscle s'étendent rarement au-delà du tiers proximal du tendon et ceux du périoste sont limités à l'insertion du tendon (Sharma and Maffulli 2005). Lorsque le tendon est entouré d'une gaine synoviale, les vaisseaux principaux pénètrent dans le mésotendon, tissu qui relie le feuillet pariétal de la gaine au feuillet viscéral, où ils forment un plexus (Sharma and Maffulli 2005), mais ces vaisseaux ne pénètrent pas dans le tendon lui-même. En l'absence de gaine, la vascularisation du corps tendineux est assurée par les vaisseaux du

paratendon qui forment un réseau dans l'építendon. De là partent les vaisseaux qui s'enfoncent dans l'endotendon et forment un réseau complexe d'anastomoses (Sharma and Maffulli 2005).

1.1.1.3 Innervation

Le tendon est richement innervé. Il n'a pas de réelle fonction motrice ; il ne reçoit donc pas d'innervation efférente mais uniquement sensorielle. Les nerfs proviennent du muscle lui-même, du tissu sous-cutané ainsi que d'autres nerfs. La plupart ne s'enfonce pas complètement dans le corps tendineux mais forme des terminaisons nerveuses à sa surface.

1.1.2 Ultrastructure du tendon

Le tendon est un tissu composé principalement d'eau (environ 70 %). Les 30 % restants, la masse sèche, sont constitués d'une matrice extracellulaire (MEC) contenant principalement des fibres de collagène parallèles et dans laquelle les cellules tendineuses sont dispersées (Goodship *et al.* 1994).

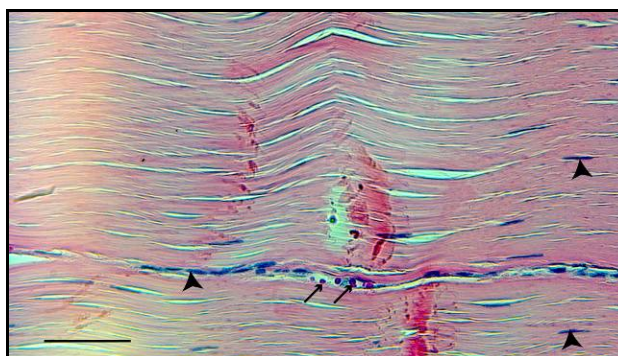


Figure 4 : Section longitudinale de tendon observée au microscope

Coloration : Hématoxyline Phloxine Safran, échelle : barre = 50 μ m

Ténocytes organisés en rangée (tête de flèche) ; Globules rouges (flèche ouverte)

1.1.2.1 Les cellules

Les cellules ne sont présentes qu'en faible quantité dans le tendon. Elles constituent des populations morphologiquement distinctes réparties dans des régions différentes du tendon (Clegg *et al.* 2007).

Les ténocytes

Les ténocytes (Figure 4) sont les cellules les plus abondantes dans le tendon. Ce sont des fibroblastes de forme allongée (18 x 6 μ m environ), contenant un cytoplasme clair en petite quantité (Williams *et al.* 1980). Leur fonction principale est la synthèse et le

renouvellement de la MEC. Chez le Cheval, trois types de ténocytes ont été identifiés en fonction de la morphologie de leur noyau en microscopie optique : les types I (noyau dense, aplati, en forme de cigare), II (noyau dense et rond, les cellules sont groupées) et III (noyau moins dense, ouvert). Les deux derniers ont une activité métabolique plus importante (Goodship *et al.* 1994).

Les ténocytes sont organisés en rangées entre les fibres de collagène, parallèlement à l'axe longitudinal du tendon. Ils présentent de fines extensions cytoplasmiques dans la MEC, venant en contact, via des jonctions-gap, avec les extensions des ténocytes des rangées adjacentes (Benjamin and Ralphs 1997). Ces extensions réalisent un réseau tridimensionnel, sensible aux variations de charge, qui permettrait au tendon de moduler, grâce à une réponse cellulaire coordonnée, la composition de la MEC en fonction des forces qu'il subit (Benjamin and Ralphs 1997; Goodship *et al.* 1994).

La distribution et la densité des cellules au sein de la MEC sont différentes d'un tendon à l'autre (Goodship *et al.* 1994) et varient en fonction de l'âge. Dans un tendon nouvellement formé ou en croissance, le ratio cellules/MEC est élevé. Les cellules les plus abondantes sont les ténoblastes, ténocytes immatures, dont la forme et la taille sont variées. Ils ont une activité métabolique importante, assurant la synthèse active des composants de la MEC. Chez l'adulte, ce ratio diminue, les ténoblastes se transforment en ténocytes et s'allongent (Sharma and Maffulli 2005). Ce ratio varie également entre les différents types de tendons (fléchisseurs versus extenseurs).

Les autres cellules

Des chondrocytes sont présents à la jonction ostéotendineuse et au passage du tendon sur les poulies osseuses (Benjamin and Ralphs 1997). Des cellules synoviales à la surface du tendon, des mastocytes, des cellules endothéliales et des axones sont également présents.

1.1.2.2 La matrice extracellulaire

La MEC est un gel hydrophile viscoélastique présentant des propriétés biomécaniques intéressantes vis-à-vis des forces de compression. Elle est composée essentiellement de collagène, de protéoglycanes et de fibres élastiques.

Le collagène

Il existe plusieurs types de collagène synthétisés par les ténocytes : les types I, II, III, V, X, XII et XIV (Woo *et al.* 1999b). Le collagène de type I représente plus de 80 % de la masse sèche du tendon chez le Cheval. Il est produit sous la forme d'un précurseur, le procollagène ou microfibrille de collagène.

Le procollagène de type I, soluble, est constitué de trois chaînes α , deux α_1 et une α_2 , formant une hélice droite (figure 5). Les molécules de procollagène contractent entre elles des liaisons électrostatiques rendant le collagène de type I insoluble. Les autres types de collagène sont présents en plus petites quantités (Clegg *et al.* 2007) : le collagène de type II se trouve à la jonction ostéotendineuse ou au niveau des poulies osseuses, les collagènes de type III, IV et V sont présents dans l'endotendon (Goodship *et al.* 1994). Le collagène de type III est également présent dans le tissu de cicatrisation du tendon.

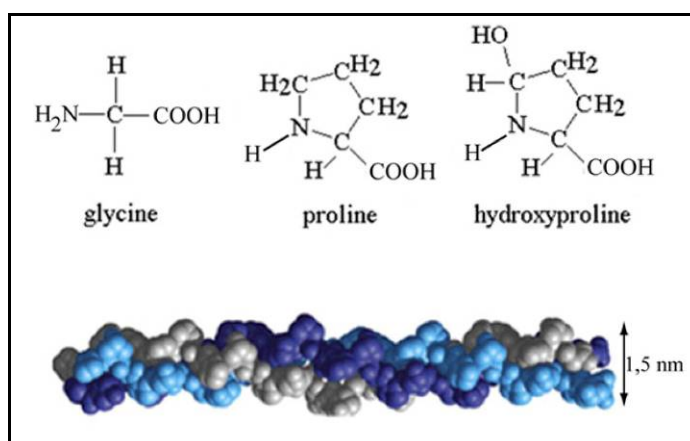


Figure 5 : Microstructure générale d'une triple hélice de collagène avec sa séquence typique d'acides aminés dans les chaînes α

D'après <http://www.chemistryland.com/ElementarySchool/BuildingBlocks/BuildingOrganicQuiz.htm>

Chaque couleur représente une chaîne α . La séquence des chaînes α est constituée de triplets glycine-acide aminé-acide aminé et parmi eux le triplet glycine-proline-hydroxyproline se répète fréquemment.

Les collagènes de types I et III ont des structures très similaires, toutefois le type III est de plus petit diamètre et est constitué de 3 chaînes α identiques, contenant des acides aminés différents de ceux du type I. Le collagène de type III est présent dans les tissus élastiques (comme les vaisseaux), subissant beaucoup de mouvements et nécessitant une grande flexibilité (comme la peau) (Williams *et al.* 1980). A l'inverse, le collagène de type I se retrouve dans les tissus subissant de grandes forces. Les proportions relatives de ces

deux types de collagène déterminent les propriétés biomécaniques du tissu dans lequel ils sont présents.

Les protéoglycanes

Les protéoglycanes constituent de 1 à 20 % de la masse sèche du tendon, dépendamment de l'âge, du site et des contraintes subies par celui-ci (Kirkendall and Garrett 1997). Ils sont composés d'un cœur protéique associé à des glycosaminoglycanes (GAG) comme le sulfate de chondroïtine, le sulfate de kératane ou le sulfate d'héparane (Smith and Webbon 1996). Le protéoglycane principal est le sulfate de dermatane, un composé de faible poids moléculaire.

Ces molécules ont un rôle de lubrification et d'agencement des fibrilles de collagène (Kannus 2000; Yoon and Halper 2005). En effet, les GAGs leur confèrent une charge négative, ce qui attire un grand nombre d'ions et entraîne un mouvement passif d'eau dans le tissu. Les protéoglycanes peuvent retenir jusqu'à 50 fois leur poids en eau ! Ces propriétés de rétention expliquent le rôle de la MEC dans la stabilisation et le maintien de l'homéostasie hydroélectrique (Kannus 2000) ainsi que les propriétés de compression et de viscoélasticité démontrées par le tendon (Kirkendall and Garrett 1997).

D'autres petites molécules telles que la glycoprotéine COMP, les fibres d'élastine, en concentration très faible, composent la MEC. Elles participent à son pouvoir de rétention d'eau et aide à stabiliser l'architecture du tendon.

1.1.3 Métabolisme

Les ténocytes participent à la production d'énergie et à la synthèse des composants de la MEC. Les trois voies métaboliques principales sont décrites au sein de cette cellule : cycle de Krebs (voie aérobie), glycolyse (voie anaérobie) et voie des pentoses-phosphates. Lorsque le jeune tendon est en croissance, les trois voies sont actives. Avec l'âge, il se produit un passage du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates diminuant au profit de la glycolyse. Les ténocytes deviennent quiescents mais conservent leur équipement enzymatique et leur capacité de synthèse. Ils peuvent être réactivés lors du processus de guérison (Hayem 2001). Le turn-over du collagène dans le tendon d'un adulte est cependant faible, comparé au ligament (Kannus 2000).

La consommation d'oxygène par les tendons est 7,5 fois plus faible que celle du reste des muscles squelettiques (Sharma and Maffulli 2005). Un faible métabolisme associé à une voie métabolique anaérobie bien développée sont des conditions essentielles au tendon pour supporter des charges et rester sous tension pendant de longues périodes, tout en évitant les risques d'ischémie et de nécrose. La contrepartie est une guérison ou une récupération lentes après une blessure ou un exercice intense (Shalabi 2004).

Le rôle de la MEC dans la régulation des cellules est très peu connu, bien qu'elle représente le composant principal du tissu tendineux (Bi *et al.* 2007). Une théorie est que la déformation de la membrane des cellules active des transporteurs d'ions. La forme des cellules et la pression subie seraient les médiateurs du contrôle mécanique de la composition de la MEC, particulièrement dans les zones de compression où on observe une augmentation du cartilage (Goodship *et al.* 1994).

1.1.4 Organisation structurale et propriétés biomécaniques du tendon

Le collagène du tendon est ordonné en plusieurs niveaux hiérarchiques, de complexité croissante. Les triples hélices de procollagène (microfibrilles) s'organisent en fibrilles reliées entre elles par des liaisons chimiques et agencées de façon décalée d'un bout à l'autre du tendon (Bi *et al.* 2007). Les fibrilles sont arrangées de façon longitudinale, mais également transversale et horizontale. A la jonction musculotendineuse, elles s'insèrent sur des processus cytoplasmiques issus des myocytes, permettant la transmission de la tension générée par la contraction des molécules d'actine et de myosine aux fibrilles. Observées au microscope électronique, les fibrilles présentent une organisation en vague. Ces ondulations sont définies par une périodicité (en μm) et un angle axial par rapport à l'axe du tendon. Les fibrilles de collagène de type I et de III présentent des ondulations de même périodicité (50-60 μm) et de même angle axial par rapport à l'axe du tendon (35° environ) (Williams *et al.* 1980).

Ces fibrilles, à leur tour, contractent des liaisons chimiques entre elles et forment la fibre de collagène. Celle-ci constitue l'unité de structure du tendon, la plus petite visible au microscope optique et qui peut être testée mécaniquement (Sharma and Maffulli 2005). De même que les fibrilles, les fibres ne sont pas toutes parallèles entre elles, elles peuvent se croiser et s'organiser en spirale. Cette structure complexe donne au tendon un rôle

« tampon » vis-à-vis des forces longitudinales, transversales, horizontales et rotationnelles (Kannus 2000) et prévient ainsi les dommages musculaires (Sharma and Maffulli 2006).

Les fibres de collagène enfin, sont regroupées en faisceaux primaires, eux même formant des faisceaux secondaires puis tertiaires (figure 6).

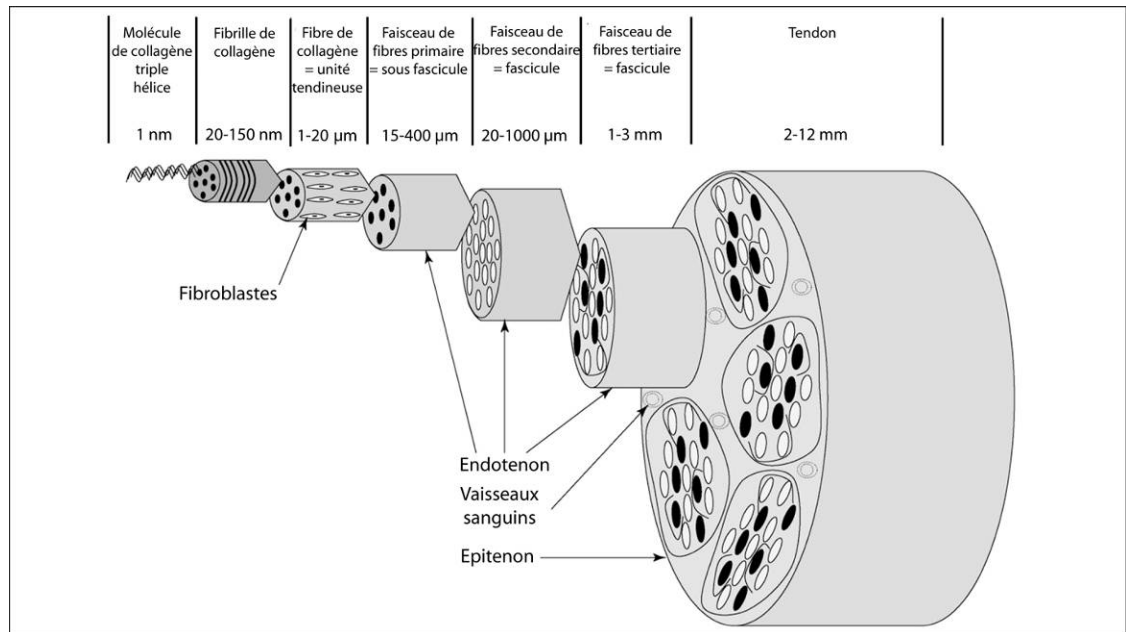


Figure 6 : Organisation hiérarchique du tendon
(adapté d'après (Richardson et al. 2007))

Les propriétés physiques des tendons sont une grande résistance à la tension, une grande élasticité et une grande flexibilité. Le comportement mécanique du collagène dépend du nombre et du type de liaisons inter et intramoléculaires (Sharma and Maffulli 2005). En s'étirant et en revenant à son état de repos comme un ressort, le tendon se comporte comme un réservoir d'énergie et le mouvement requiert ainsi moins d'énergie (Benjamin and Ralphs 1997). La force de tension est directement liée à l'épaisseur du tendon et à son contenu en collagène.

La courbe de déformation des tendons est caractéristique : elle est non linéaire (figure 7).

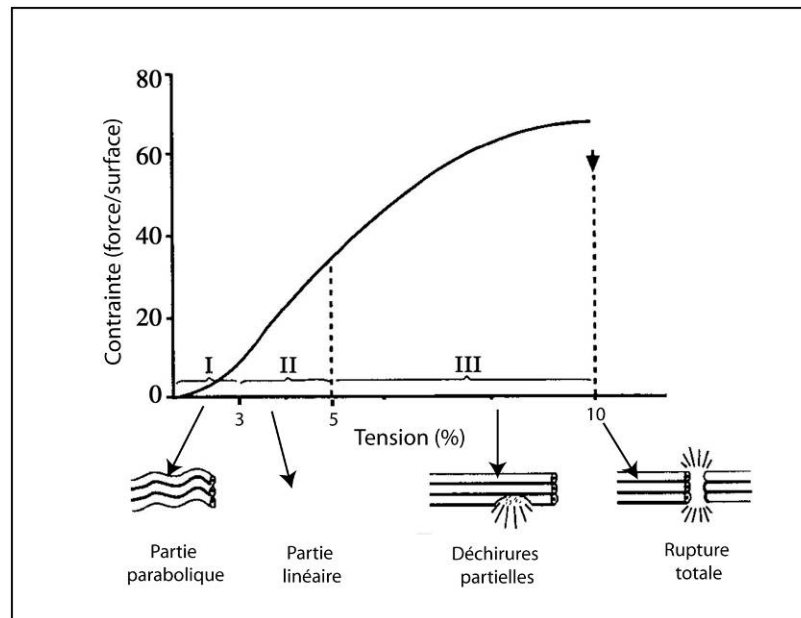


Figure 7 : Courbe de déformation du tendon en fonction de la tension
(Sharma and Maffulli 2005)

La partie non linéaire (« toe ») représente une forte extension du tendon pour une application de faibles charges, d'où une forme parabolique. Elle correspond à l'extension des ondulations des fibres de collagène (Wilmink *et al.* 1992). Ces ondulations se retrouvent au sein d'un même fascicule et entre plusieurs fascicules. Chez le Cheval, *in vitro*, les ondulations s'aplatissent lorsque le tendon subit une extension d'environ 3 % (McIlwraith 2002). A ce stade, lorsque la charge est soustraite, le tendon retourne à sa longueur originelle.

La deuxième partie, linéaire, représente une élongation du tendon proportionnelle à la charge appliquée. Elle résulte du glissement des triples hélices de procollagène entre elles, les fibres de collagène s'alignant entre elles. Des dommages irréversibles surviennent lorsque les limites normales de l'ondulation sont dépassées (Benjamin and Ralphs 1997; Wilmink *et al.* 1992). En théorie, dans cette région et jusqu'à 5 % d'élongation, la déformation engendrée du tendon est réversible.

Entre 5 et 6 %, des dommages microscopiques apparaissent, correspondant au glissement des fibrilles les unes par rapport aux autres. Le tendon ne retourne pas à son état de repos lorsque la charge est soustraite. Au-delà de 6 %, les dommages deviennent macroscopiques et la rupture survient entre 10-20 % d'extension (Goodship *et al.* 1994).

1.2 Deuxième partie : Physiologie de la guérison tendineuse

1.2.1 Méthodes d'étude de la guérison des tendons

1.2.1.1 Modèles expérimentaux

In vitro

Différents modèles sont disponibles, en fonction de l'échelle à laquelle l'étude est réalisée, cellulaire ou tissulaire.

Les cultures isolées : les cellules sont obtenues après digestion du tissu tendineux par des collagénases puis mises en culture. Il est alors possible de déterminer les unités de formation de colonies fibroblastiques (CFU(s)-f) et d'étudier les différentes populations cellulaires présentes.

Les explants : ce sont des fragments de tendon que l'on met en culture. La structure est donc complète et l'environnement partiellement conservé. Ce modèle permet d'étudier *in vitro* la réponse cellulaire pendant la guérison, la pathogénie ainsi que l'influence du milieu sur cette guérison (facteurs de croissance...) (Carpenter *et al.* 1999; Thomopoulos *et al.* 2005). Ils constituent une étape préliminaire permettant de viser des étapes-clés du processus de guérison à vérifier plus tard *in vivo*. Les principaux avantages de ce modèle sont l'affranchissement de la gestion d'animaux vivants, l'obtention d'échantillons en grand nombre et la réduction du nombre de variables non contrôlées. Son principal inconvénient est l'absence des forces de tension qui participent à la réorganisation de la MEC et à l'orientation des fibres de collagène.

In vivo

Les recherches sont généralement orientées sur les tendons fléchisseurs, sans doute en raison des challenges que représente la guérison de ceux-ci pour les chirurgiens et de l'importance de leur rôle comparativement aux extenseurs. Elles ont été effectuées sur deux principaux modèles, la transection ou l'injection de collagénases, mais d'autres modèles sont également décrits.

Les transections constituent un modèle représentatif de la guérison tendineuse lors de traumatismes comme les lacérations. Elles peuvent être :

- simple, pour tester la guérison du tendon avec ou sans suture (Jann *et al.* 1992),
- avec « gap healing », qui consiste en la création d'un défaut pleine épaisseur par ténectomie totale ou partielle (tiers central du tendon). Cette technique est décrite chez le Cheval (Bertone *et al.* 1990; Watkins *et al.* 1985), le Lapin (Chong *et al.* 2007), la Poule (Cao *et al.* 2002) et le Chien (Burks *et al.* 1990). Chez le Cheval, il permet de tester des greffes de tendon autologues (Reiners *et al.* 2002; Valdes-Vazquez *et al.* 1996), ainsi que des techniques ou des matériaux de sutures (Bertone *et al.* 1990). Cette méthode est considérée satisfaisante chez le Cheval (Watkins *et al.* 1985) : la plupart des lacérations surviennent sur leurs membres et résultent en un espace du fait de la rétraction musculaire et du poids qui éloignent les abouts tendineux (Carpenter and Hankenson 2004). Cependant, il a été rapporté chez le Cheval une douleur excessive (sueur, décubitus prolongé, hypophagie, augmentation de la fréquence cardiaque) suite à une ténectomie de 3 cm du TFSD, ayant conduit à l'euthanasie de l'animal (Bertone *et al.* 1990). Une alternative serait l'application de ce modèle à un tendon extenseur. En effet, nous savons que, lors de lacération atteignant un extenseur, le pronostic est généralement bon. D'ailleurs, la ténectomie du tendon extenseur latéral du doigt sur un membre pelvien dans le traitement du harper (Sullins 2002) ou lors de la collecte de greffon tendineux (Reiners *et al.* 2002) ne résulte qu'en des signes d'inconfort modérés et temporaires.

Les collagénases bactériennes constituent un modèle permettant de mimer les conditions rencontrées lors de dégénérescence tendineuse (Williams *et al.* 1984), et seraient un modèle représentatif des tendinites dans lesquelles sont impliquées des collagénases non bactériennes (Goodship *et al.* 1994). Dans ce modèle, des collagénases bactériennes de type I, filtrées et stérilisées, sont injectées dans le corps du tendon. L'injection est suivie par la dissolution rapide de la MEC et des fibres de collagène, se manifestant par une inflammation significative, des dommages vasculaires, une hémorragie et de la nécrose cellulaire (Williams *et al.* 1984). La sévérité de la lésion induite dépend du volume et de la concentration administrés. Chez le Cheval, la plupart des études de guérison des tendinites est réalisée sur les tendons fléchisseurs du doigt avec ce modèle (Dahlgren *et al.* 2005; Kersh *et al.* 2006; Nixon *et al.* 2008). Cependant, suite à l'injection, les chevaux développent dans les premières 24 heures une boiterie sévère, de non appui, qui, même si

elle s'améliore, persiste au-delà d'une semaine (Williams *et al.* 1984). De plus, ces modèles nécessitent l'euthanasie des animaux. Pourtant, nous savons que, lors de lacération impliquant un extenseur, le pronostic est généralement bon.

1.2.1.2 Méthodes d'évaluation

Évaluation histologique

L'évaluation histologique permet de caractériser l'architecture et l'organisation des différents éléments du tissu. Après fixation dans un milieu approprié, généralement le formol, le tendon est inclus dans la paraffine, coupé puis coloré. La coloration la plus commune est l'hématoxyline et éosine (HE) qui colore les noyaux des cellules en bleu et les fibres en rose-rouge. Ainsi, les fibres de collagène et d'élastine apparaissent de la même couleur et peuvent donc être difficiles à différencier. Une coloration plus intéressante serait l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) qui colore les fibres de collagène en orangé, les fibres élastiques restant rosées. Ces colorations permettent d'apprécier l'organisation du tissu tendineux, sa composition, sa morphologie et de déterminer la nature et la maturité des éléments cellulaires et intercellulaires (Gruber and Stasky 1999). L'utilisation de la coloration de rouge de picrosirius associée à la lumière polarisée exploite la propriété de biréfringence du collagène et permet une évaluation qualitative de l'orientation, l'organisation et la maturation des fibres de collagène. Les colorations à la safranine-O ou à la toluidine permettent d'identifier les GAGs contenus dans la MEC, en les colorant respectivement en rose ou en bleu.

La technique d'immunofluorescence exploitant l'utilisation de conjugués fluorescents permet de typer le collagène. Le collagène présent dans le tendon est en majorité du collagène de type I mais peut être de type III dans le tissu de guérison. Chez le Cheval, un anticorps anti-collagène de type I spécifique à l'espèce équine est disponible mais pas pour le collagène de type III (Watkins *et al.* 1985).

Évaluation biomécanique

Les tests biomécaniques permettent de déterminer les propriétés mécaniques inhérentes d'un matériel (Woo *et al.* 1999b) (figure 8). Le tendon étant principalement soumis à des forces de tension, ses propriétés ne sont évaluées que dans un seul axe.

Les tests sont réalisés entre 0 et 37 ° C, sur échantillon hydraté (Woo *et al.* 1999b), soit directement après prélèvement soit sur échantillon conservé par congélation et décongelé juste avant le test. La congélation n'affecte pas les propriétés biomécaniques du tendon (Woo *et al.* 1999b). Un échantillon de tendon ou un complexe os-tendon-os est fixé entre deux pinces dans un axe vertical et étiré de façon constante par une machine hydraulique (type Instron®). Il est alors possible de mesurer la charge subie par la structure en fonction de son élongation depuis son état de repos. La courbe obtenue est une courbe non linéaire à partir de laquelle peuvent être déterminées la rigidité linéaire (en Newtons/mm, pente de la partie linéaire de la courbe), la charge maximale à la rupture (en Newtons), l'élongation maximale à la rupture (en mm) et l'énergie absorbée au moment de la rupture (en Newtons.mm, aire sous la courbe). Ceci représente les propriétés structurales du tendon (1- 8, a) (Woo *et al.* 2000).

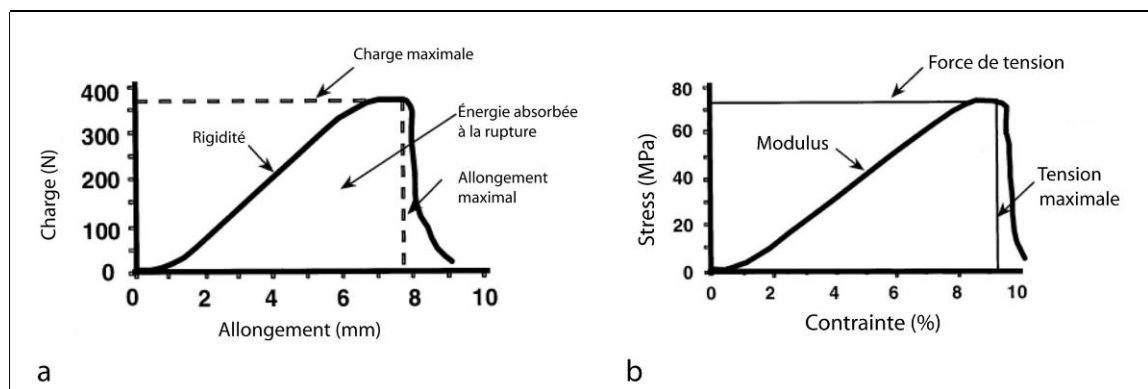


Figure 8 : Propriétés structurales (a) et mécaniques (b) d'un tendon
(Woo *et al.* 2000)

A partir de ce même test, il est possible de déterminer ses propriétés mécaniques en standardisant la charge et l'élongation en fonction ses dimensions : la charge est normalisée par sa section transverse, ce qui permet de standardiser les mesures par rapport à des spécimens de différentes largeur ou épaisseur. La variable obtenue est le stress (en MPa) subi par le tendon. L'élongation est standardisée par la longueur du tendon au repos, donnant la variable contrainte (en %). La courbe de stress en fonction de la contrainte

permet de déterminer le modulus (pente de la partie linéaire de la courbe), le stress maximal à la rupture et la contrainte maximale à la rupture (figure 8, b) (Woo *et al.* 2000).

1.2.2 Étapes de la guérison tendineuse

Le processus de guérison tendineuse est un phénomène complexe. Il est divisé en quatre étapes successives, mais en réalité celles-ci se superposent (Woo *et al.* 1999a). L'exemple de la guérison d'une lacération est utilisé dans la description suivante.

La première étape est la phase vasculaire, pendant laquelle les érythrocytes, les plaquettes et des cellules inflammatoires, notamment les neutrophiles, envahissent le site de lésion et forment un caillot.

Par le biais de signaux autocrines et paracrines, la cascade inflammatoire se met en place, ce qui constitue la seconde étape. Dès les premières 24 heures, les monocytes, neutrophiles et macrophages deviennent la population prédominante et procèdent à la phagocytose des débris nécrotiques. Des substances chimiotactiques et vasoactives, comme des facteurs de croissance (PDGF, IGF-I, TGF- β_1 , BMP-2), la substance P ou l'oxyde nitrique (Sharma and Maffulli 2006) sont libérées ; Elles augmentent la perméabilité vasculaire, initient l'angiogénèse et participent au recrutement de nouvelles cellules inflammatoires, des fibroblastes et à leur prolifération. La lésion contient alors des plaquettes, des macrophages, des leucocytes et des cellules souches mésenchymateuses (Woo *et al.* 1999a).

Ces cellules contribuent à l'initiation de la phase suivante, qui débute après quelques jours : la phase de prolifération. Les dernières cellules à migrer vers la lésion sont les fibroblastes. Ils amorcent la synthèse de collagène. Initialement, le dépôt de collagène de type IV et V est assuré par les cellules endothéliales, et la production de collagène de type III par les fibroblastes (ténocytes) (Watkins *et al.* 1985). Durant cette phase, la synthèse de collagène de type III est la plus importante mais celle du collagène de type I augmente progressivement. Les fibres de collagène sont organisées de façon lâche. Les liaisons chimiques entre les fibrilles se forment et participent à la stabilisation et au renforcement précoce du site lésionnel. Cette étape, qui se poursuit pendant quelques semaines (quatre chez le Cheval (Watkins *et al.* 1985)), aboutit à la formation d'un pont entre les deux extrémités lésées du tendon. Celui-ci est alors de consistance gélatineuse. Au microscope, le tissu de cicatrisation est de cellularité élevée et se présente sous la forme de

fibres de collagène de petit diamètre organisées de façon aléatoire (Watkins *et al.* 1985). La proportion de collagène est alors plus faible relativement aux autres constituants. Ni l'organisation des cellules et des fascicules de collagène en rangées parallèles ni l'aspect ondulé à l'échelle de la fibrille de collagène ne sont reconnaissables (Williams *et al.* 1980). Les ténocytes sont plus larges (22-30 μm par 8-11 μm) et leur cytoplasme est plus basophile (Williams *et al.* 1980).

Après 6 semaines environ, débute la phase de remodelage. Durant cette étape, le tissu de cicatrisation change de taille et de forme. La cellularité diminue et la synthèse de GAGs débute tandis que celle de collagène se poursuit. Cette phase est divisée en deux temps : un temps de consolidation et un temps de maturation. La consolidation débute à environ 6 semaines et se prolonge jusqu'à 10 semaines. Durant cette période, le tissu qui était riche en cellules devient fibreux, plus dense. Le métabolisme des ténocytes reste élevé et une quantité importante de collagène de type I est synthétisée. Il forme des faisceaux denses qui remplacent progressivement le tissu lâche et se réorganisent, avec les ténocytes, dans le sens des lignes de tension. Après ces 10 semaines débute la maturation. Elle peut durer jusqu'à près d'un an. Durant ce temps, le tissu fibreux se transforme en un tissu cicatriciel qui ressemble à du tendon. Durant la dernière moitié de cette période, le métabolisme cellulaire décroît et la vascularisation diminue. Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) jouent un rôle important lors de cette phase. Les MMP-9 et les MMP-13 participent uniquement aux phénomènes de dégradation tandis que les MMP-2, MMP-3 et MMP-14 participent à la fois à sa dégradation et à sa synthèse. Elles facilitent ainsi le remodelage tissulaire (Sharma and Maffulli 2005).

Malgré la phase de remodelage, le tissu cicatriciel contient encore une quantité importante de collagène de type III, comparativement au tendon normal. Or ce type de collagène est de nature fibrillaire et de plus petit diamètre que le collagène de type I. La résistance à la tension d'un tissu formé de collagène de type III est donc moindre que celle d'un tissu formé de collagène de type I. La proportion relative de collagène de type III lors du processus de guérison varie en fonction des études. Celle-ci peut atteindre 20 à 30 % de la masse sèche du tendon après rupture totale du TFSD (Williams *et al.* 1980) alors qu'elle est inférieure à 20 % dans un modèle de tendinite induite aux collagénases (Dahlgren *et al.* 2005). Le modèle aux collagénases induit une lésion close dans tous les plans contrairement aux transsections, entraînant entre autres des différences dans la répartition des contraintes

biomécaniques et dans la disponibilité d'une matrice pour la migration des cellules. Ceci pourrait contribuer à des réponses de guérison différentes entre les modèles.

Les modèles de guérison tendineuse actuels sont basés sur l'existence de deux voies en fonction de l'origine de la réponse cellulaire : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Jann and Pasquini 2005). Dans la voie intrinsèque, les cellules type macrophages et les fibroblastes migrent à partir de l'épitenon et de l'endotendon durant la phase de prolifération, alors que dans la voie extrinsèque, ces cellules proviennent de la gaine tendineuse, du tissu sous-cutané, des fascias, du périoste, des structures osseuses et de la circulation sanguine. La voie extrinsèque se met en place surtout lorsque le tendon est lésé à l'intérieur de sa gaine et que la gaine elle-même est endommagée. Dans ces conditions, les ténocytes « exogènes » sont prédominants par rapport aux ténocytes endogènes. Ils envahissent le site et permettent aux tissus environnants de s'attacher au site de guérison. Des adhérences se créent ainsi entre la gaine et le tendon, ce qui par la suite nuit à son glissement et donc à son bon fonctionnement.

Le mécanisme de réparation tendineuse est orchestré par les ténocytes qui maintiennent un fin équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques de la MEC. Initialement, le collagène est produit par les cellules de l'épitenon, puis par celles de l'endotendon. La contribution relative de chacun des types de cellules est influencée par le type de traumatisme, sa localisation, la présence ou non d'une gaine synoviale et le stress induit par le mouvement après que le processus de cicatrisation s'est mis en route. Les cellules de la gaine produisent moins de collagène et moins de GAGs que celles de l'épitenon ou de l'endotendon mais elles prolifèrent plus rapidement (Sharma and Maffulli 2005).

Ainsi, la cicatrisation du tendon est lente et ne permet donc pas de restaurer ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles normales (Bi *et al.* 2007). Cela compromet les performances futures de l'individu et augmente le risque de récurrences (Clegg *et al.* 2007; Goodship *et al.* 1994).

1.3 Troisième partie : les tendinites chez le Cheval

Les principales lésions tendineuses rencontrées chez le Cheval sont les tendinites. Elles sont particulièrement fréquentes chez les chevaux athlètes et génèrent des pertes économiques considérables, en particulier en raison de leur taux important de récides.

1.3.1 Définition

La tendinite est une inflammation du tendon et/ou de la jonction musculotendineuse. Chez le Cheval, elle désigne plus particulièrement une inflammation des tendons fléchisseurs du doigt causée par des contraintes excessives lors de l'exercice. Cette lésion peut aller de la déchirure mineure à, plus rarement, la rupture complète du tendon. Macroscopiquement, dans la phase chronique, le tendon lésé est épaissi, amorphe et présente une coloration marron brun (Goodship *et al.* 1994).

Les tendinites semblent être site-spécifiques et espèce-spécifiques (Goodship *et al.* 1994) : par exemple, la tendinite du fléchisseur superficiel du doigt est la cause la plus fréquente de boiterie chez le cheval de course. Son incidence est estimée à 43 % chez ces chevaux (Dowling *et al.* 2000) et les membres les plus souvent atteints sont les membres thoraciques.

1.3.2 Pathophysiologie des tendinites chez le cheval

La pathophysiologie des tendinopathies est complexe à établir en raison du faible nombre de biopsies réalisées (Magra and Maffulli 2007), et beaucoup de théories existent dont la principale est la théorie mécanique.

1.3.2.1 Théorie mécanique

Cette théorie fait encore débat et s'articule autour de deux idées : soit le tendon normal subit une fois une contrainte non physiologique, un étirement brutal, dépassant son seuil d'élasticité, soit il est soumis à des contraintes submaximales répétées qui induisent des microdommages et prédisposent à la rupture.

La cause la plus fréquente des tendinites serait une surcharge de poids sur un tendon déjà fragilisé, soit par l'âge, l'élévation de température, des microlésions anciennes, une mauvaise conformation (chevaux droit-jointés) ou un mauvais parage (talons laissés trop hauts provoquant une descente du boulet et une tension importante sur le TFSD), des

défauts d'allure (soulagement d'une zone douloureuse)... soit par une tendinite précédente (Goodship *et al.* 1994).

Les contraintes répétées, une augmentation rapide de la durée et de l'intensité de ces forces sont des causes communément admises. Chez un cheval au galop, lorsque le membre rentre en contact avec le sol, le boulet subit une hyperextension et les tendons fléchisseurs subissent des forces de tension importantes. Le tendon s'allonge jusqu'à un point proche de la rupture (l'élongation du tendon est en moyenne de 11 à 16 %, ce qui correspond presque aux limites physiologiques de 10-20 % aboutissant à la rupture). Les microtraumatismes engendrés affectent en premier les fibres les plus courtes (McIlwraith 2002), affaiblissant le tendon et conduisant à sa rupture partielle voire totale. Chez l'adulte, contrairement au jeune, les fibrilles au cœur du tendon atteignent la région « toe » de la courbe de contrainte (figure 7) plus rapidement que les fibres périphériques. L'ondulation est plus faible ce qui explique l'incidence des lésions centrales (Dowling *et al.* 2000). Avec l'âge également, les ondulations ont tendance à diminuer, la limite de la région « toe » est donc plus faible (Wilmink *et al.* 1992).

Pratiqué de façon régulière, avec une intensité raisonnable, l'exercice améliore la résistance et l'élasticité du tendon, mais dans les cas de surutilisation chronique, de multiples lésions microscopiques se produisent à l'intérieur de la MEC et la coalescence de ces microlésions qui n'ont pas le temps de guérir conduit à la formation d'une déchirure, généralement dans le corps du tendon (Hayem 2001). D'ailleurs, une réduction du diamètre des fibres de collagène dans la région centrale du TFSD est associée à l'exercice (McIlwraith 2002) et une plus grande proportion de collagène de type III est également observée. Des changements dans le contenu en GAGs, ainsi que la diminution de leur taux de glycosylation sont également constatés (Goodship *et al.* 1994). Cela constituerait une preuve de l'existence de microtraumatismes induits lors de l'entraînement. Ces microtraumatismes répétés s'accumulent et provoquent la destruction de la MEC et la séparation des fibres tendineuses. Ils accélèrent ainsi la dégénérescence du tendon, résultant en une tendinite clinique. De plus, un tendon réagit à une surcharge répétitive au-delà du seuil par de l'inflammation de sa gaine, la dégénérescence de son corps ou une combinaison des deux (Sharma and Maffulli 2006).

Les MMPs zinc et calcium dépendantes, de part leur implication dans le remodelage de la matrice du tendon, joueraient elles aussi un rôle-clé dans la pathophysiologie de la

dégradation tendineuse (Goodship *et al.* 1994). Un déséquilibre entre les activités des MMPs et de leurs inhibiteurs altérerait l'homéostasie, conduisant à des changements dans le tendon (Magra and Maffulli 2007). Chez le Rat, il a été montré que les MMPs jouaient un rôle dans l'homéostasie et la réparation du tendon en situation non pathologique, puisque leur inhibition augmente la force nécessaire à la rupture du tendon ainsi que l'énergie absorbée au moment de la rupture (Pasternak *et al.* 2007). Par ailleurs, chez le Rat également, le ratio de l'expression des inhibiteurs des MMPs TIMP-1/MMP-13 est supérieur à un lorsque le tendon est soumis à des contraintes physiologiques (de 1 à 6 %), alors qu'il est inférieur à un en l'absence de contraintes et dans les tendinopathies (Lavagnino *et al.* 2003). Leur implication n'est toutefois pas encore complètement clarifiée.

La rupture des fibres tendineuses est immédiatement suivie d'une hémorragie intra-tendineuse puis de la formation d'un hématome. Les fibroblastes altérés et les cellules de l'inflammation libèrent des enzymes qui aggravent la dégradation des fibres. Il s'agit du phénomène prédominant dans la dégradation du tissu tendineux. Ces phénomènes sont accompagnés de douleur, de chaleur et de tuméfaction de la zone atteinte. Lorsque l'hématome se réduit, une cicatrice se forme, laquelle est constituée de collagène de type III, immature et agencé de manière aléatoire. Les faibles qualités mécaniques de ce type de collagène expliquent la fréquence des récives des tendinites chez le Cheval. Dans des cas plus chroniques, il a également été observé une différenciation fibrochondrogénique avec une augmentation du collagène II, IX, X, XI et une augmentation expression du gène aggrécan (Clegg *et al.* 2007).

1.3.2.2 Théorie thermique

Durant la locomotion, chez le Cheval, 8 à 13 % de l'énergie stockée par le tendon est convertie en chaleur (Goodship *et al.* 1994) au fur et à mesure que le tendon est tendu puis détendu (figure 9).

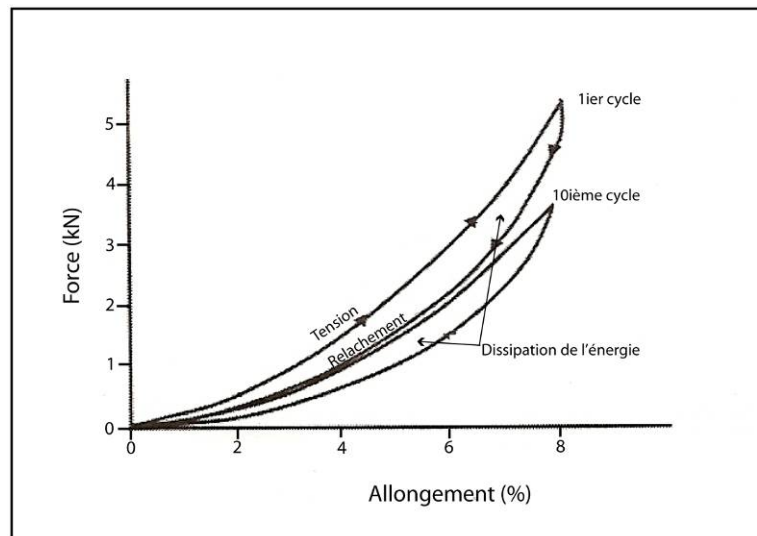


Figure 9 : Cycle d'allongement et de relâchement du tendon fléchisseur superficiel du doigt chez le Cheval

Au fur et à mesure que le tendon est mis sous tension puis détendu, une partie de l'énergie emmagasinée par le tendon est perdue sous forme de chaleur (Goodship *et al.* 1994).

Des températures aussi hautes que 45° C ont été enregistrées au cœur du TFSD au cours du galop. Bien que sur un court laps de temps une telle température ne soit pas préjudiciable, la viabilité cellulaire peut être compromise si le tendon subit une telle température de façon prolongée ou répétée. Cette hyperthermie centrale ne provoque pas de mort cellulaire mais engendre une fragilité des fibres et endommage la MEC (Dowling *et al.* 2000) et expliquerait la localisation centrale de la majorité des lésions de tendinite.

1.3.2.3 Théorie de l'ischémie

Le tendon est un tissu métaboliquement actif et nécessite un approvisionnement en sang adéquat. A défaut, des phénomènes dégénératifs se mettent en place (Rees *et al.* 2006). L'ischémie surviendrait lorsque le tendon est soumis à une charge de tension maximale. Au moment du relâchement du tendon, un phénomène de reperfusion se produit, entraînant la libération de superoxydes, des radicaux libres toxiques pour les tissus créant des dommages cellulaires locaux. Chez l'Homme, une enzyme anti-oxydante, la peroxiredoxine 5, voit son expression augmentée dans les cas de tendinopathies dégénératives, ce qui supporterait l'hypothèse du rôle d'un stress oxydatif dans la pathophysiologie des tendinopathies (Wang *et al.* 2001). La mise en place de bandages trop serré sur le membre serait également responsable d'une mauvaise vascularisation du tendon.

1.3.2.4 Autres hypothèses

Chez l'Homme, un des effets secondaires de l'antibiothérapie aux fluoroquinolones est son association à des tendinites ou autres tendinopathies. En effet, il semble que les fluoroquinolones inhibent le métabolisme des ténocytes réduisant ainsi leur prolifération et altérant la production de MEC (Sendzik *et al.* 2005).

1.3.3 Traitements

Les objectifs des traitements sont de diminuer l'inflammation et la douleur, réduire la taille du tissu cicatriciel et permettre la restauration d'une structure et d'une fonction les plus proches possible de celles du tendon original, afin de permettre une meilleure récupération et un retour à l'utilisation initiale du cheval dans les meilleures conditions. En phase aiguë, le but est de diminuer les effets délétères de l'inflammation sur le collagène et la MEC et réduire la formation de l'œdème. Les principaux traitements sont résumés dans le tableau I.

Les soins locaux sont réalisés sur des lésions tendineuses peu importantes ou en complément d'autres mesures.

TRAITEMENT	PRINCIPE ET RÉSULTATS		SUCCÈS	RÉFÉRENCES
Hydrothérapie froide ou glace	Vasoconstriction	Évite la libération des fluides, protéines et médiateurs de l'inflammation par les vaisseaux lésés, limite hématome et enflure		(Henninger 1994).
Bandage	Légère pression	Augmente la pression du liquide interstitiel et contre la perte de fluides par les vaisseaux => réduit l'enflure		
Antiphlogistiques		Limite l'œdème		
Parage		Éviter les contraintes anormales sur le tendon		
Immobilisation	Confinement au box	Immobilisation stricte non recommandée (réduction des propriétés biomécaniques du tendon par diminution contenu en eau et protéoglycanes, augmentation des liaisons réductibles entre molécules de collagène)		(Kirkendall and Garrett 1997; Sharma and Maffulli 2006)
AINS : phénylbutazone...	Contrôle de l'inflammation	Ne pas utiliser pour faire disparaître la boiterie, utilisation prolongée responsable d' ulcérations gastro-intestinales ou lésions rénales		
Acide hyaluronique	Injection dans gaine synoviale	Favorise la cicatrisation, réduit les adhérences. Influe sur la migration et la maturation des cellules. Bénéfices contestés		(Dyson 2004; Henninger 1994)
Fumarate de β-aminopropionitrile	Liaison à l'enzyme lysine-oxydase	Empêche la formation de croisements de collagène, favorise l'alignement des fibres dans l'axe longitudinal (sous exercice contrôlé). Mais ralentissement de la cicatrisation ou altération du métabolisme des ténocytes (Dahlgren <i>et al.</i> 2001)=> abandon	45-50 % (1)	(Dahlgren <i>et al.</i> 2001; Reef <i>et al.</i> 1997; Yamamoto <i>et al.</i> 2002)
Cautérisation	Onguents révulsifs ou thermocautére	Transformer une condition chronique en phénomène actif (afflux de sang et cellules inflammatoires) mais augmentation de la quantité de tissu fibreux, propriétés viscoélastiques affectées, temps de guérison prolongé.	19 %	(Genovese and al. 1996; Silver <i>et al.</i> 1983)
Ténotomie longitudinale		Diminue de la taille de la lésion (évacuation hématome) et favorise la revascularisation. Invasif . De moins en moins pratiquée.	68 %	(Allen 1992)
Desmotomie de la bride radiale	Implication du muscle fléchisseur superficiel dans le support du membre	Déplace le centre de tension maximale du tendon. Invasif Principale complication : desmite du ligament suspenseur du boulet.	51-66 % (1)	(Henninger 1994; Hogan and Bramlage 1995)

Tableau I : Résumé des principaux traitements des tendinites chez le Cheval

En bleu : local, en vert : médical et en violet : chirurgical

Le succès est défini comme le pourcentage de chevaux ayant couru au moins 5 courses sans récurrence de la lésion (Yovich *et al.* 1995) lorsqu'il est suivi de (1), ou le pourcentage de retour en course sans récurrence sinon.

La desmotomie du ligament accessoire du TFSD est une intervention chirurgicale qui a été proposée dans le but d'augmenter l'élasticité de l'unité musculotendineuse (implication du muscle, plus élastique) et ainsi réduire les contraintes sur le tendon lésé (Hogan and Bramlage 1995). Cependant, une étude sur des cadavres suggère que, bien que la charge soit transférée au muscle suite à la desmotomie, les contraintes sur le TFSD et sur le ligament suspenseur du boulet augmentent en raison de l'hyperextension de l'articulation métacarpophalangienne que l'intervention induit (Alexander *et al.* 2001).

Des traitements plus modernes comme le laser, les thérapies par les ultrasons ou électromagnétiques ont été développés mais sans preuve de leur efficacité chez le Cheval.

Comparée aux autres conditions orthopédiques, dont les traitements et pronostic se sont améliorés depuis les dernières années, il n'y a pas de changement significatif dans l'efficacité des traitements de la tendinite et dans son incidence (Goodship *et al.* 1994). Chacun de ces nombreux traitements présente ses inconvénients, le principal étant qu'aucun d'eux ne peut empêcher le phénomène de fibroplasie et la formation d'une cicatrice. Même si un remodelage se produit au cours de la cicatrisation, le tissu qui en résulte n'est pas « normal » et ne possède ni la compliance ni la fonctionnalité du tendon d'origine. De plus, il n'y a aucune preuve que ces traitements soient plus efficaces que la longue période de repos et de réhabilitation qui leur est associée. Ainsi, les nouveaux traitements devraient viser la régénération et non la guérison du tissu tendineux. Dans cette optique, la thérapie cellulaire, en particulier par les cellules souches, suscite de nos jours le plus vif intérêt.

1.4 Quatrième partie : Les cellules souches mésenchymateuses

1.4.1 Définition et terminologie

La première définition de « cellule souche » (SC) date du 19^{ième} siècle et désigne des cellules germinales primordiales quiescentes (Wilson cité par (Taylor *et al.* 2007)). Dans « cellule souche », le terme « souche » implique la capacité de ces cellules à se renouveler indéfiniment, c'est-à-dire à se diviser en donnant une cellule-fille qui reste dans un état indifférencié, sans caractéristique tissulaire spécifique, et une deuxième cellule-fille qui se différencie (Dennis and Caplan 2004). Suivant leur provenance, ces cellules sont divisées en deux catégories principales, embryonnaires ou dérivées de tissus adultes, elles-mêmes

regroupant plusieurs types de CSs (figure 10). Les CSMs sont des CSs adultes dérivant du tissu mésodermique.

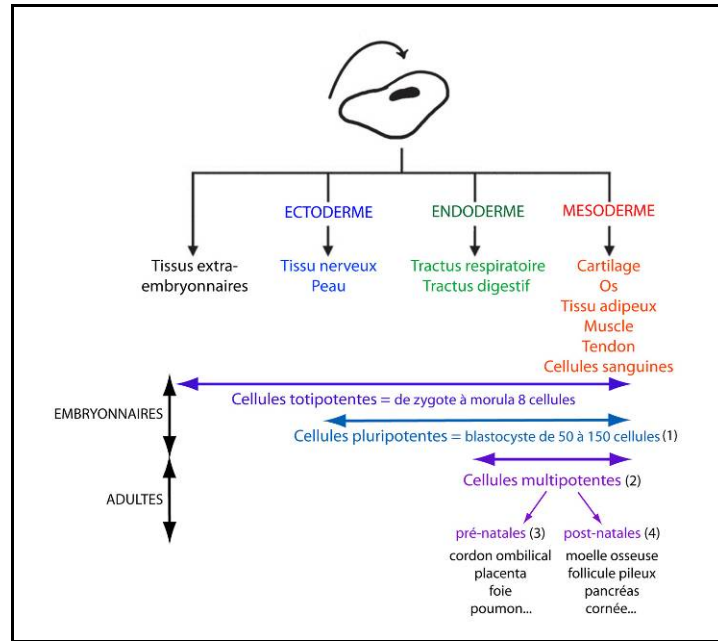


Figure 10 : Classification des différents types de cellules souches

D'après (Koch *et al.* 2008)

(1) = (Burt *et al.* 2008; Fortier 2005; Ringe *et al.* 2002) ; (2) = (Lee and Hui 2006) ; (3) = (Erices *et al.* 2000; In 't Anker *et al.* 2003; In 't Anker *et al.* 2004; Koch *et al.* 2007; Passeri *et al.* 2009) ; (4) = (Arnhold *et al.* 2007; Lee *et al.* 2004; Puglisi *et al.* 2008; Shih *et al.* 2005; Trubiani *et al.* 2005; Vidal *et al.* 2007; Yokoo *et al.* 2008)

On appelle « niche » le microenvironnement comprenant tous les éléments entourant immédiatement les CSs dans leur état « naïf », c'est-à-dire les cellules qui sont en contact avec elles (notamment périvasculaires), la MEC ou les molécules solubles qui s'y trouvent (Kolf *et al.* 2007). Cet environnement spécialisé, hautement régulé, interactif contrôle le devenir des CSs de façon spatio-temporelle (Mitsiadis *et al.* 2007; Moore and Lemischka 2006). Il protège les CSs des stimuli de différenciation, d'apoptose ou autres qui modifieraient leur réservoir, limite la production excessive de CSs et la progression vers le cancer (Moore and Lemischka 2006). Il autorise cependant leur différenciation lors de la régénération d'un tissu (Bi *et al.* 2007; Kolf *et al.* 2007). L'équilibre entre les cellules en quiescence et celles en activité est ainsi conservé. La niche permet également de restreindre les CSs à une fonction spécifique, le devenir des cellules étant contrôlé par des facteurs de

croissance et des cytokines dont l'activité est modulée par les protéines de la MEC (Loeffler and Roeder 2002).

1.4.2 Propriétés

1.4.2.1 Prolifération et différenciation

Les CSs constituent des réservoirs de cellules remplaçant les cellules endommagées ou vieillissantes et sont ainsi responsables de l'homéostasie tissulaire (Blau *et al.* 2001; Fortier 2005; Loeffler and Roeder 2002). Leur réactivation est influencée par la libération d'EGF et de PDGF ou par l'hypoxie modérée existant dans le tissu lésé (Muschler and Midura 2002). Elles subissent alors une expansion clonale.

Les CSs adultes ont une durée de vie limitée par rapport aux CSs embryonnaires et leur capacité de régénération décroît avec l'âge du fait de la diminution du nombre de CSs disponibles dans le tissu avec le temps (figure 11) (Caplan *et al.* 2007). Ce nombre dépend également du site de prélèvement (Peng *et al.* 2008), et de l'état de santé du donneur (Majors *et al.* 1997). *In vitro*, elles peuvent tout de même proliférer jusqu'à 40 passages sans se différencier (Jiang *et al.* 2002; Pittenger *et al.* 1999).

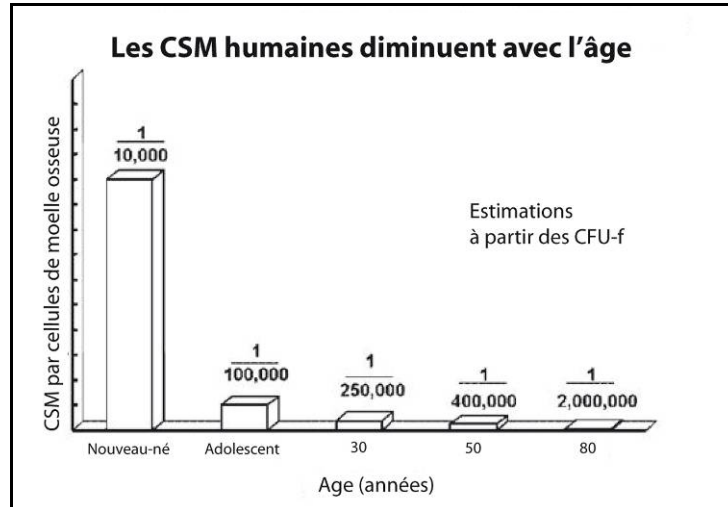


Figure 11 : Diminution de la quantité de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse avec l'âge chez l'Homme

D'après (Caplan 2007)

Lorsqu'elles sont exposées à des signaux biologiques spécifiques (pression partielle en oxygène, pH du milieu extracellulaire ou des stimuli mécaniques (Muschler and Midura 2002)), les CSs sont capables de se différencier en cellules spécialisées dont les phénotypes

diffèrent grandement de la cellule-mère (Barry 2003). Les types cellulaires obtenus correspondent à ceux de l'organe dans lequel elles se trouvent. Les CSs sont notamment capables de donner naissance aux cellules constitutives du tissu squelettique comme les ostéoblastes, les chondrocytes, les ténocytes ou les myocytes (figure 12) (Caplan *et al.* 2007). *In vitro*, cette différenciation peut être induite par le contact avec des cellules non lésées, comme l'induction de l'ostéogénèse dans des CSMs en culture avec des ostéoblastes (Kolf *et al.* 2007). Les CSMs de la moelle osseuse auraient une meilleure capacité de différenciation en ostéocytes (Peng *et al.* 2008; Vidal *et al.* 2007) et en chondrocytes (Kisiday *et al.* 2008; Vidal *et al.* 2008) que les CSMs du tissu adipeux. La capacité de différenciation en ostéocytes et en chondrocytes serait altérée par l'âge du donneur (Roobrouck *et al.* 2008).

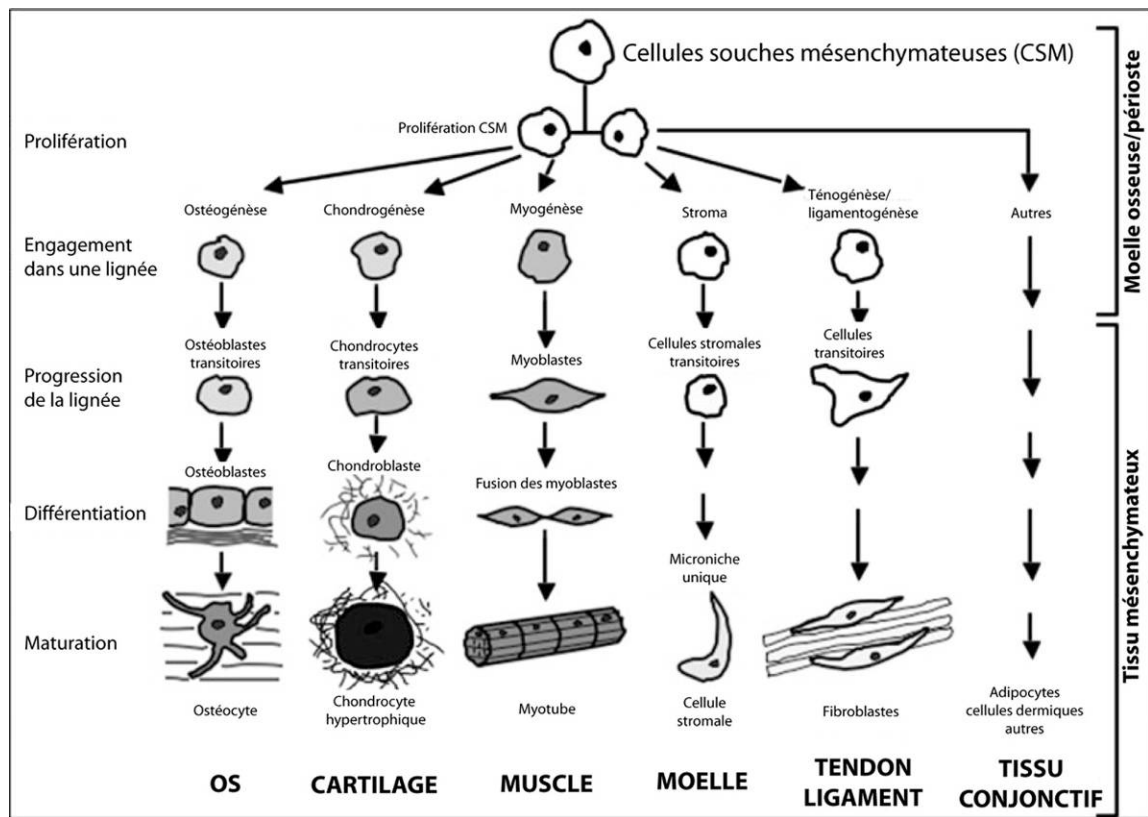


Figure 12 : Diagramme illustrant les capacités de différenciation des cellules souches mésenchymateuses

D'après (Caplan 2007)

1.4.2.2 Plasticité et flexibilité/réversibilité

La plasticité des CSs est leur capacité à se dédifférencier puis se redifférencier dans une autre lignée ou à se transdifférencier. L'existence de cette propriété est très controversée (Ringe *et al.* 2002).

La flexibilité et la réversibilité des CSMs correspondent à la capacité de ces cellules à modifier leur taux de prolifération pendant et en dehors de leur cycle cellulaire, à changer la lignée cellulaire dans laquelle elles s'engagent et à perdre ou à réacquérir leur capacité de renouvellement (Delorme *et al.* 2006). *In vitro* par exemple, des ostéoblastes peuvent se transdifférencier en adipocytes ou en chondrocytes (Song and Tuan 2004). Ce changement ne correspond pas à la sélection d'une sous-population cellulaire puisque ce phénomène s'observe à l'échelle d'une unique cellule (Delorme *et al.* 2006).

Ces propriétés sont déterminées par des manipulations *in vitro*. La question est de savoir si elles sont bien inhérentes aux cellules et dans quelle mesure les manipulations effectuées influencent ces propriétés (Bianco *et al.* 2001).

1.4.2.3 Effets autocrines et paracrines

Initialement, l'hypothèse permettant d'expliquer la réparation des tissus après un traitement aux CSs était la différenciation de CSs immatures en cellules du tissu lésé et la repopulation de l'organe par ces cellules. Cependant, le faible taux de greffe et de survie des cellules après implantation (de 1 à 5 %), la rapidité d'apparition de l'effet bénéfique (amélioration de la fonction organique en moins de 72 h, temps insuffisant pour la différenciation et la régénération) et surtout le fait qu'une amélioration de la fonction organique et de la lésion puissent être reproduites lors de l'utilisation d'un milieu acellulaire ayant contenu des CSs, contredisent cette hypothèse et suggèrent l'intervention de facteurs paracrines (Crisostomo *et al.* 2008). Une étude a permis de définir le profil sécrétoire des CSMs humaines. La concentration de 44 des 120 cytokines étudiées était significativement augmentée dans le surnageant de culture des cellules (Schinkothe *et al.* 2008). Ces molécules pourraient intervenir selon différents mécanismes :

- L'augmentation de l'angiogénèse : les facteurs impliqués sont le VEGF, le HGF, le bFGF (Crisostomo *et al.* 2008), l'angiopoïétine 2, le bFGF, TIMP-1 ou TIMP-2 (Schinkothe *et al.* 2008). Lors d'un stress, la libération de ces facteurs améliore la perfusion sanguine régionale ainsi que la protection et la survie des tissus.

- La modulation immunitaire : chez l'Homme, les CSMs agissent sur un grand nombre de cellules du système immunitaire (tableau II) (Krampera *et al.* 2006; Tyndall *et al.* 2007). Leur hypoimmunogénécité s'explique par le fait que ces cellules expriment faiblement le HLA et le CMH-I et n'expriment pas de molécules costimulantes. Il est donc possible d'utiliser des cellules allogéniques dans un traitement, le principal avantage étant la disponibilité immédiate de ces cellules (banques) (Nauta and Fibbe 2007).

- Les effets antiapoptotiques : ils se traduisent par l'expression de gènes associés au mécanisme de réparation de l'ADN, la surexpression d'enzymes antioxydantes et l'augmentation des systèmes de détoxification (Crisostomo et al. 2008).

- L'autoguidage (« homing ») correspond à la propriété des cellules de migrer spécifiquement vers et de se différencier dans un tissu lésé sous l'influence de signaux (Kolf et al. 2007). Chez le Rat, des CSMs injectées dans la veine de la queue sont capables de migrer et de s'implanter dans un cœur où une ischémie a été expérimentalement induite (Jiang et al. 2006). Cette migration est en partie liée à l'expression de Stro-1, les cellules Stro-1-positives ayant une capacité accrue à migrer (Bensidhoum et al. 2004). *In vitro*, cette migration peut être régulée par le complexe HGF/c-Met, dont l'expression est augmentée lors de lésion tissulaire et les MMPs sécrétées par les CSs (Son et al. 2006). *In vivo*, les facteurs de croissance et les chémokines libérés lors d'une lésion tissulaire sont responsables de la migration des CSs dans le tissu endommagé (Blau et al. 2001). Sont impliqués le G-CSF, la MCP-3 et/ou l'IL-8 (Crisostomo et al. 2008). La migration dépend également de la disponibilité de la MEC, support de la migration cellulaire, ainsi que de la qualité des cellules et de la concentration en ligands permettant l'attachement des cellules à la MEC (Muschler and Midura 2002). Les facteurs de croissance et de différenciation libérés sont responsables de la régulation des gènes exprimés par les CSs dans leur nouveau tissu (Blau et al. 2001). Après une période de culture prolongée, la capacité d'autoguidage des cellules diminue, probablement par régulation de l'expression des récepteurs aux chémokines ou des molécules d'adhérence (Rombouts and Ploemacher 2003).

SYSTÈMES	CIBLES	EFFETS	CONCLUSION/REMARQUES	RÉFÉRENCES
Co-culture CSMS activées par GM-CSF et IL-4	Monocytes	Inhibition de leur différenciation en cellules dendritiques		(Jiang <i>et al.</i> 2005)
Barrière poreuse entre CSMS et cibles	Lymphocytes B	Inhibition de leur prolifération (arrêt en phase G0/G1) et de leur différenciation (diminution IgA, IgM et IgG) Diminution de l'expression des récepteurs aux chémokines	Effets liés à la libération de facteurs solubles	(Corcione <i>et al.</i> 2006) (Patel <i>et al.</i> 2008)
Surnageant culture de CSMS	Lymphocytes B et T	Pas d'effet	Présence des 2 types cellulaires nécessaire	(Nauta and Fibbe 2007)
Co-culture de CSMS avec cible	Lymphocytes CD4+ et CD8+	Inhibition de leur prolifération	Cytotoxicité et activation non affectée	(Ramasamy <i>et al.</i> 2008)
Co-culture de CSMS avec cible	Cellules dendritiques, LTH-1, LTH-2, NK	Diminution de la production de TNF α et INF γ Augmentation de la production de IL-4, IL-10, PGE $_2$	Diminution des cytokines pro-inflammatoires Augmentation des cytokines suppressives, importance des PGE $_2$ car effets minimisés si utilisation d'un inhibiteur	(Aggarwal and Pittenger 2005) (Aggarwal and Pittenger 2005; Crisostomo <i>et al.</i> 2008)
Surnageant culture de CSMS activées par splénocytes	Lymphocytes T, cellules progénitrices des cellules dendritiques	Diminution de la prolifération des lymphocytes T, inhibition partielle de différenciation en cellules dendritiques	Médiation par IL-6 dont la sécrétion est augmentée après activation par les splénocytes	(Djouad <i>et al.</i> 2007)
Infusion de CSMS <i>in vivo</i>		Prolongation de la durée des greffes de peau, diminution des risques de rejet		(Nauta and Fibbe 2007)
Co-culture de CSMS avec cible	Lymphocytes B Lymphocytes T	Augmentation modérée des IgG liée à la libération d'IL-6 et d'INF γ Activation par les CSMS jouant le rôle de CPA après stimulation par l'INF γ	Effet immunostimulant !	(Patel <i>et al.</i> 2008) (Nauta and Fibbe 2007)

Tableau II : Effets immunomodulateurs des cellules souches mésenchymateuses et cellules-cibles impliquées

Vert = effets immunodépresseurs et diminution de l'inflammation, rose = effets immunostimulants

- Le remodelage de la MEC : il s'effectue par l'augmentation de la cellularité et la diminution de la production des protéines de la MEC comme les collagènes de types I, III ou les TIMP-1 (Crisostomo *et al.* 2008).

En conclusion, les CSs peuvent être comparées à un orchestre (Smith 2008b) : elles ont la capacité de se différencier en cellules synthétisant la MEC (rôle des musiciens) et synthétisent des facteurs autocrines (chef orchestre). Elles sont capables de stimuler la prolifération cellulaire et de protéger les cellules dans un tissu endommagé, permettant ainsi de promouvoir la réparation et la régénération de ce tissu tout en limitant des dommages supplémentaires.

1.4.3 Effets secondaires possibles

1.4.3.1 Transmission de maladie

Lors d'administration systémique, il existerait un risque d'infection lié à la contamination des CSs lors des manipulations *ex vivo*. Ce risque existe également lors d'implantation de cellules allogéniques (Sundin *et al.* 2006) ou xénogéniques (van der Laan *et al.* 2000) si les cellules sont issues d'un patient malade. De part leurs propriétés immunomodulatrices, les CSMs pourraient induire une immunosuppression vis-à-vis des bactéries, virus ou fongi, de même qu'elles supprimeraient la réponse anti-tumorale. Sont particulièrement à risque les individus immunosupprimés ou débilités (Nauta and Fibbe 2007). Des moyens simples de limiter ce risque seraient de manipuler les CSs dans un environnement stérile, sélectionner des donneurs et des receveurs de statut immunitaire connu (paramètres cliniques et hématologiques normaux, mais le portage asymptomatique ne peut être exclus (Koch *et al.* 2008)) ou utiliser des cellules autologues.

1.4.3.2 Transformation maligne des cellules

Des instabilités chromosomiques sont apparues au sein de CSs de tissu adipeux suite à une culture de 5 mois. Ces cellules échappaient à l'apoptose dans 50 % des cas. Cet échappement, les remaniements chromosomiques et la disparition de l'inhibition de contact sont des caractères de cellules tumorales (Rubio *et al.* 2005). Le risque est réduit par rapport aux cellules embryonnaires mais existant (Lee and Hui 2006). Dans une étude sur des CSMs de moelle osseuse, une sous population CD133+ est apparue, dès le 3^{ème} passage dans 1 sur 40 échantillons. Ces cellules perdaient l'inhibition de contact, présentaient des remaniements chromosomiques et étaient capables d'induire des tumeurs

lors de leur injection à des organismes immunodéficients (Wang *et al.* 2005). La transformation maligne serait liée à une augmentation graduelle de l'activité des télomérases et à une expression accrue du gène c-myc. (Miura *et al.* 2006). Quoi qu'il en soit, l'hypothèse selon laquelle ces modifications sont causées par la culture *in vitro* est plus probable que celle d'une population préexistante de cellules tumorales d'après plusieurs auteurs. Il est donc préférable, dans le cadre d'une utilisation clinique, de limiter le nombre de passages précédant l'utilisation des CSMs.

1.4.3.3 Formations ectopiques

Il a été montré qu'entre 43 et 77 jours de culture *in vitro* (7 à 12 passages), la capacité de différenciation en ostéoblastes augmentait progressivement au cours des passages (Wagner *et al.* 2008). Ainsi, on comprend les risques de minéralisation des tissus colonisés par les CSs après administrations systémique ou locale, particulièrement après un nombre élevé de passages.

1.4.3.4 Immunogénicité

Les CSMs allogéniques peuvent persister dans un individu immunodéprimé ou à des sites immunoprivilégiés mais elles peuvent également induire une réponse immunitaire chez des individus immunocompétents (Nauta and Fibbe 2007).

1.4.4 Prélèvement, isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses adultes

1.4.4.1 Prélèvement

Les CSs adultes sont prélevées plus facilement et de façon plus éthique que les cellules embryonnaires. Les critères permettant de choisir la source adéquate de CSMs sont un accès facile, des cellules aisément caractérisables et des protocoles bien établis (Barry 2003).

Chez le Cheval, les deux sources principales de CSMs sont la moelle osseuse et le tissu adipeux, les techniques de prélèvement étant relativement aisées et peu invasives (Richardson *et al.* 2007). Le sang veineux périphérique serait une source moins invasive (Koerner *et al.* 2006), mais sa fragilité, sa capacité d'expansion limitée et la difficulté d'obtention des CSs en font une source peu intéressante.

La récolte des cellules de moelle osseuse est une technique peu invasive et s'effectue entre les sternèbres, à l'aide d'un trocart, après anesthésie locale du site. Le nombre de cellules nucléées (contenant la population de CSMs) est d'environ 6 millions/mL de moelle osseuse après deux semaines d'expansion. Cependant, l'hémopéricarde est une complication potentielle sévère (Durando *et al.* 2006).

Les cellules nucléées issues du tissu adipeux sont nombreuses et ne nécessitent donc pas d'être mises en culture pour expansion (5 millions/mL de tissu adipeux disponibles sous 72h (Vidal *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2007)). Leur taux de prolifération *in vitro* est également plus haut que celui des cellules de moelle osseuse. L'obtention de CSMs est donc plus rapide et moins chère (Richardson *et al.* 2007). Cependant, le prélèvement de tissu adipeux, réalisé dans la région glutéale, est invasif et nécessite des incisions de plusieurs centimètres (Vidal *et al.* 2007). De plus chez le Cheval, l'étude des CSMs issues du tissu adipeux est plus récente que celle des CSMs issue de la moelle osseuse.

Ainsi, la moelle osseuse reste la source de CSs la plus riche (Fortier *et al.* 1998), et la plus fiable (Koerner *et al.* 2006) dans cette espèce.

1.4.4.2 Isolement

Les CSMs de la moelle osseuse proviennent de la fraction non hématopoïétique du stroma. Chez le Cheval, des études ont montré que la quantité de CSMs pouvait atteindre $6,4 \pm 3,4 \cdot 10^9$ /L de moelle osseuse (Smith *et al.* 2003; Vidal *et al.* 2006).

Méthode classique

Les CSMs ont la capacité d'adhérer au plastique des pétris contrairement aux cellules hématopoïétiques et aux autres cellules non hématopoïétiques (Friedenstein *et al.* 1976). Après deux à quatre jours, le milieu de culture est changé et avec lui sont éliminées les cellules non adhérentes (Prockop 1997). Une population hétérogène de cellules est alors obtenue (Bianco *et al.* 2001; Kolf *et al.* 2007), incluant, en plus des CSs, des cellules réticulées, des adipocytes, des cellules ostéogéniques, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des macrophages (Lee and Hui 2006). Au sein des CSMs, deux morphologies sont importantes à considérer : les cellules allongées en fuseau, avec deux processus cytoplasmiques s'étendant en directions opposées, correspondant à des cellules immatures et multipotentes, et les cellules larges et aplaties, polygonales sans processus ou des très courts, correspondant à des cellules plus matures ayant moins de potentiel de

prolifération ou de différenciation (Colter *et al.* 2000; Colter *et al.* 2001). Chez l'Homme, on considère que 30 % de ces cellules adhérentes sont des CSs (Prockop 1997). Chez le Cheval de moins de 5 ans, on peut attendre une quantité de 1 à 2×10^5 cellules adhérentes après 3 jours de culture d'un prélèvement de moelle osseuse de 10 mL (Fortier 2005). Avant leur confluence, ces cellules peuvent être séparées et mises en culture à densité plus faible. Après plusieurs passages, elles deviennent plus homogènes (Prockop 1997).

Méthodes utilisant un gradient de densité

Les produits les plus couramment utilisés sont le Percoll® ou le Ficoll®. Ce sont des solutions de haute densité mais de faible viscosité et de faible pression osmotique. Ils permettent de séparer la fraction mononucléaire contenant les CSs des globules rouges, des granulocytes, des plaquettes et des précurseurs immatures de la lignée myéloïde (Fortier 2005; Lennon and Caplan 2006; Pountos *et al.* 2007) (figure 13).

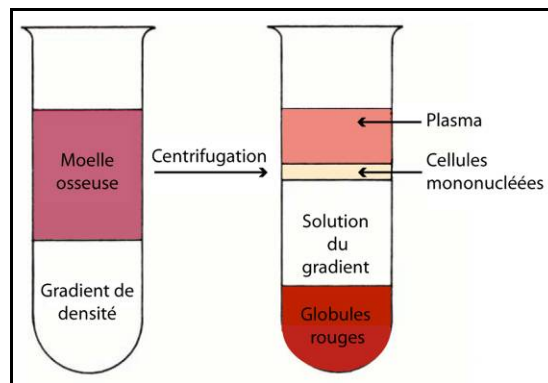


Figure 13 : Séparation des composants de la moelle osseuse après centrifugation sur gradient de densité

Le mélange du prélèvement avec une solution de métrizoate de sodium, comme dans le Lymphoprep®, permet de favoriser l'agrégation des globules rouges, augmentant leur taux de sédimentation et favorisant ainsi l'isolement des cellules mononucléées (Boyum 1968).

A ce jour, aucun protocole optimal permettant d'obtenir le meilleur rendement d'isolement des CSs n'a été proposé et le sujet est peu étudié. Une ancienne étude comparant le Percoll® et le Ficoll® a montré que le Percoll® permettait d'obtenir plus de cellules constituant des CFUs (Vannier *et al.* 1980). Plus récemment, la comparaison du Ficoll® et du Lymphoprep® a démontré la meilleure efficacité du Ficoll® en terme d'isolement des CSs de la moelle osseuse, de CFUs et de réponse à un facteur chimiotactique, ce qui pourrait expliquer les différences dans la guérison observées chez

des patients souffrant d'ischémie cardiaque aiguë et traiter avec une perfusion de CSMs (Seeger *et al.* 2007).

Méthodes utilisant les marqueurs de surface

Les CSs présentent à leur surface des antigènes particuliers qui peuvent être utilisés afin de les isoler et/ou les caractériser (figure 14). Il existe pléthore de marqueurs positifs de ces antigènes mais aucun marqueur unique positif spécifique aux CSs n'a pu être mis en évidence (Kolf *et al.* 2007). Il n'existe même pas de consensus à propos d'un profil antigénique exact permettant de les identifier. Un accord général s'est tout de même établi sur le fait que les CSMs ne présentent pas les antigènes typiques de la lignée hématopoïétiques (CD11b, CD14, CD 31, CD34, CD45 et CD117) (Delorme *et al.* 2006; Kolf *et al.* 2007) mais qu'elles possèdent d'autres antigènes de surface tels que CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 et CD166 (Delorme *et al.* 2006; Taylor *et al.* 2007) ou encore CD13, CD28, CD33 et HLA de classe I (Wexler *et al.* 2003). L'anticorps anti-Stro-1 est également utilisé pour sélectionner les CSMs dans la moelle osseuse (Dennis and Caplan 2004). Cependant, le marqueur Stro-1 est progressivement perdu au cours de la culture cellulaire et ne permet donc d'identifier les CSMs que dans les premiers passages (Kolf *et al.* 2007).

Marqueurs hématopoïétiques		Facteurs de croissance et cytokines	
CD1a (T6)	Neg	CD25 (Interleukin-2R)	Neg
CD14 (Lipopolysaccharide receptor)	Neg	CD71 (Transferrin receptor)	Pos
CD34	Neg	CD114 (Granulocyte-colony stimulating factor receptor)	Neg
CD45 (Leukocyte common antigen)	Neg	CD117 (Stem cell factor receptor)	Neg
CD133 (AC133)	Neg	CDw119 (Interferon γ R)	Pos
Molécules d'adhésion		CD120 a & b (Tumor Necrosis factor- α 1&2 R)	Pos
CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)	Neg	CD121 a & b (Interleukin-1R a&b chain)	Pos
CD44 (Hyaluronate receptor)	Pos	CD123 (Interleukin-3R)	Pos
CD50 (Intercellular adhesion molecule 3)	Pos	CD124 (Interleukin-4R)	Pos
CD54 (Intercellular adhesion molecule 1)	Pos	CD126 (Interleukin-6R)	Pos
CD56 (Neural cell adhesion molecule)	Pos	CD127 (Interleukin-7R)	Pos
CD58 (Lymphocyte function-associated antigen 3)	Pos	CD140a (Platelet derived growth factor receptor)	Pos
CD62E (E-selectin)	Neg	FGFR (Fibroblast growth factor receptor)	Pos
CD62L (L-selectin)	Pos	CD271 (Low affinity nerve growth factor receptor)	Pos
CD62P (P-selectin)	Neg	Autres marqueurs	
CD102 (intercellular adhesion molecule 2)	Pos	CD3 (CD3 complex)	Neg
CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1)	Pos	CD9 (Tetraspannin)	Pos
CD144 (Calherin 5)	Neg	CD13 (Aminopeptidase N)	Pos
CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule)	Pos	CD19 (B-lymphocyte Surface Antigen B4)	Neg
Intégrines		CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	Pos
CD11a (Lymphocyte function-associated antigen-1 α)	Neg	CD80 (B7-1)	Neg
CD11b (Macrophage-1 antigen)	Neg	CD83 (HB15a)	Neg
CD11c (Complement receptor type 4 a chain)	Neg	CD86 (B7-2)	Neg
CD18 (Lymphocyte function-associated antigen-1 β)	Neg	CD90 (Thy-1 glycoprotein)	Pos
CD29 (Very late antigen β)	Pos	CD105 (Endoglin)	Pos
CD49a (Very late antigen a1)	Pos	CD146 (MUC18, Mel-CAM, S-endo)	Pos
CD49b (Very late antigen a2)	Pos	CD157 (BP-3 or Bone Marrow Stromal cell antigen-1)	Pos
CD49c (Very late antigen a3)	Pos	SH3 (Src homology 3)	Pos
CD49d (Very late antigen a4)	Neg	D7-FIB	Pos
CD49e (Very late antigen a5)	Pos	STRO-1	Pos
CD49f (Very late antigen a6)	Pos	HLA-A,B,C	Pos
CD51 (Vitronectin R a chain)	Neg	SSEA-3,4	Pos
CD61 (Vitronectin R β chain)	Pos		
CD104 (β_4 integrin)	Pos		

Figure 14 : Liste des marqueurs rapportés à ce jour permettant d'identifier les cellules souches mésenchymateuses.

D'après (Pountos *et al.* 2007)

Les trois principales méthodes d'isolement utilisant ces marqueurs sont le FACS, le MACS et la technique de sélection négative associée à un isolement par gradient (Neagu *et al.* 2005; Pountos *et al.* 2007) :

Pour le FACS (figure 15), les cellules sont incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre un marqueur de surface puis d'un anticorps secondaire lié à un fluorochrome, dirigé contre le premier anticorps. Parfois, l'anticorps primaire est directement fixé à un fluorochrome. Les cellules sont ensuite passées devant un laser qui excite le fluorochrome (Baumgarth and Roederer 2000; Tung *et al.* 2004). L'isolement des

cellules est basé sur l'intensité de la fluorescence émise par celles-ci. Si l'intensité dépasse le seuil établi, la cellule possède le marqueur et le cytomètre l'isole.

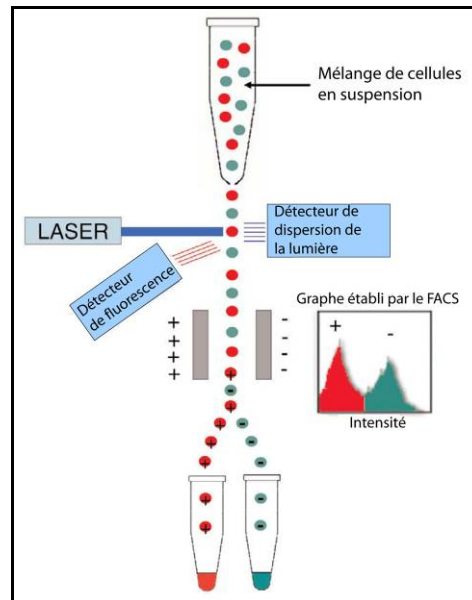


Figure 15 : Séparation des cellules souches par le FACS

D'après (Pountos et al. 2007)

Le MACS repose sur le même principe, l'anticorps étant lié à des billes magnétiques et non à un fluorochrome. L'application d'un champ magnétique externe permet de séparer les cellules positives « magnétisées » des cellules négatives (Inokuchi *et al.* 2005).

Pour la technique combinée, l'utilisation d'une solution contenant des billes présentant des anticorps permet de précipiter les cellules présentant les antigènes correspondants et de conserver les cellules négatives à l'interface plasma/gradient.

L'utilisation des marqueurs de surface est une méthode d'isolement particulièrement intéressante. Cependant, la plupart de ces marqueurs ne sont pas bien connus et ne sont pas spécifiques à toutes les espèces ni même au sein d'une même espèce : par exemple le CD34 est présent chez la Souris et chez l'Homme précocement mais disparaît rapidement chez ce dernier (Delorme *et al.* 2006). Ils sont également communs à d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales et musculaires) et plus de 50 antigènes seraient nécessaires afin de correctement les caractériser (Pittenger *et al.* 1999). Chez le Cheval, une seule étude rapporte l'utilisation du FACS sur des cellules de cordon ombilical, avec l'utilisation des marqueurs CD54, CD90, CD105, CD146 positifs et CD34, CD45 et CD133 négatifs (Hoynowski *et al.* 2007) mais ces marqueurs ne sont pas validés dans cette espèce.

Cependant, un laboratoire travaille actuellement à la détermination d'un profil de 7 marqueurs : les CSMs équine seraient positives pour les marqueurs CD172a, CD29, CD44 et Stro-1 et négatives pour les marqueurs CD14, CD34 et CD45 (Radcliffe and Fortier 2007). La limite est que ces anticorps ne sont pas spécifiques du Cheval.

1.4.4.3 Caractérisation

Actuellement, il n'y a pas de consensus sur un standard en or permettant la caractérisation des CSMs (Pountos *et al.* 2007) et plusieurs critères sont généralement utilisés pour les identifier.

CFU

Lorsqu'elles sont ensemencées à faible densité, les CSMs prolifèrent et donnent naissance à des unités de formation de colonies fibroblastiques (CFUs-f). Chaque colonie dérive de la division d'une unique cellule (Friedenstein *et al.* 1974). Le ratio des CFUs-f sur les cellules ensemencées évalue l'efficacité à se multiplier (prolifération) (Friedenstein *et al.* 1974). Celui-ci varie en fonction des conditions de culture (densité), et de l'espèce impliquée (Bianco *et al.* 2001). Une moyenne de 300 colonies par pétri de 100 mm de diamètre est rapportée chez l'Homme (Lennon and Caplan 2006), mais les conditions ne sont pas précisées et les comparaisons sont donc difficiles.

La différenciation en trois lignées

Bien que multipotentes, ces cellules ne sont pas capables de se différencier spontanément *in vitro* (Pittenger *et al.* 1999). En modifiant le milieu de culture de façon spécifique, il est toutefois possible d'orienter sélectivement leur différenciation (figure 16) (Guillot *et al.* 2007), sans qu'elles subissent de réduction des télomères ni de mutations chromosomiques (Pacini *et al.* 2007).

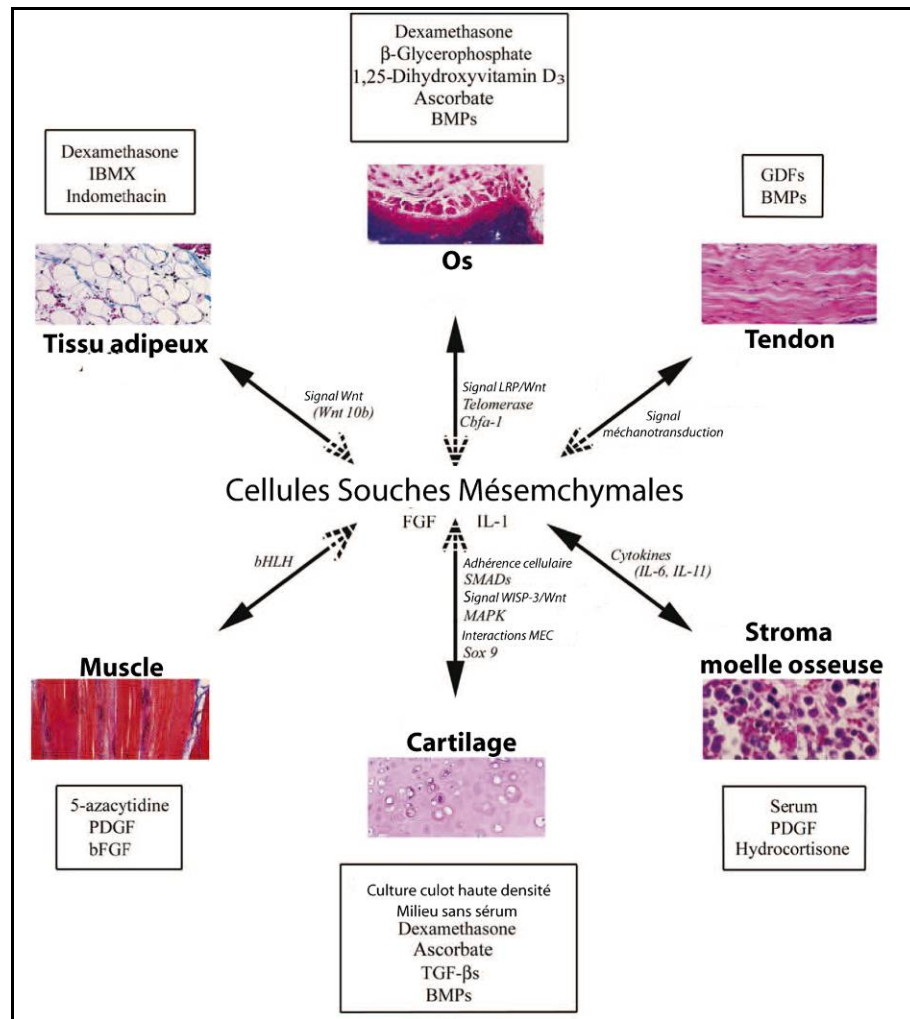


Figure 16 : Différentiation des cellules souches en fonction des facteurs utilisés dans le milieu de culture

D'après (Tuan *et al.* 2003)

Généralement, elle se fait selon trois types cellulaires, à savoir adipeux (adipocytes), osseux (ostéocytes) et cartilagineux (chondrocytes) (Vidal *et al.* 2006). La démonstration de cette différenciation se fait par colorations histologiques et plus récemment par mise en évidence de l'expression de certains gènes (tableau III).

LIGNÉE	HISTOLOGIE	EXPRESSION GÉNIQUE
OSTÉOGENÈSE	Phosphatase alcaline : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium (Arnhold <i>et al.</i> 2007) Dépôt de calcium : Von Kossa (Pittenger <i>et al.</i> 1999) ou Rouge d'Alizine	Runx2, Osteonectin (Reed and Johnson 2008; Taylor <i>et al.</i> 2007)
CHONDROGÈNESE	Protéoglycanes, glycosaminoglycanes : bleu d'Alcian ou safranine O (Koerner <i>et al.</i> 2006) ou bleu de toluidine	SOX9, collagen 2a1 (Reed and Johnson 2008; Taylor <i>et al.</i> 2007)
ADIPOGÈNESE	Gouttes lipidiques : Oil Red O	PPAR γ , Lipoprotein lipase (Taylor <i>et al.</i> 2007),

Tableau III : Résumé des méthodes histologiques et d'expression génique permettant la démonstration de la différenciation des cellules souches en trois lignées

Le concept de CSs est en perpétuelle évolution. Il est donc préférable de les définir par leur fonction biologique plutôt qu'en tant qu'identité cellulaire et que par une liste de caractéristiques observables (Blau *et al.* 2001; Loeffler and Roeder 2002). En l'absence de marqueurs moléculaires ou génétiques spécifiques permettant de rigoureusement les caractériser (Cai *et al.* 2004), le consensus est de nommer les cellules isolées « cellules stromales (mésenchymateuses) multipotentes » plutôt que « cellules souches mésenchymateuses » puisque le terme de « souche » revêt une signification bien spécifique (Horwitz *et al.* 2005). Les termes « cellules mésenchymateuses progénitrices », « cellules progénitrices adultes multipotentes » ou encore « cellules stromales » sont également retrouvés dans la littérature (Dennis and Caplan 2004; Jiang *et al.* 2002)) bien que non parfaitement synonymes (Muschler and Midura 2002).

Finalement, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire a déterminé quatre critères minimaux permettant de définir les Cellules Stromales Multipotentes humaines (Dominici *et al.* 2006):

- l'adhérence au plastique des pétris de culture,
- l'expression des marqueurs CD105, CD73 et CD90 (≥ 95 % des cellules isolées sont positives pour ces marqueurs),
- l'absence d'expression des marqueurs CD45, CD34, CD11b, CD19, CD79a et HLA-DR (≤ 2 % des cellules isolées positives), et
- la capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Chez le cheval, seuls les premier et dernier critères peuvent être, actuellement, rigoureusement appliqués pour la caractérisation des CSMs.

1.4.5 Potentiel dans les affections tendineuses

L'apport exogène de CSMs se justifie par la faible présence de CSs dans le tissu endommagé (Taylor *et al.* 2007) afin de favoriser le processus de guérison, en particulier dans les tissus paucicellulaires comme le tendon. Des études ont déjà été réalisées dans plusieurs espèces afin d'évaluer les résultats d'un tel traitement, dans des modèles de laceration tendineuse ou, chez le Cheval, de tendinite induite aux collagénases, puis plus récemment dans des essais cliniques équins (tableau IV).

Plusieurs modalités existent pour délivrer les CSMs au site lésionnel : injection simple du prélèvement brut, injection dans un véhicule ou implantation d'une matrice (Pountos *et al.* 2007). Il est préférable de ne pas utiliser l'injection simple de moelle osseuse puisqu'elle nécessite de grands volumes qui sont préjudiciables aux fibres intactes et est pauvre en CSMs. On évite également les éventuels effets délétères des autres composants (Smith *et al.* 2003). L'utilisation d'un véhicule (plasma autologue plus ou moins enrichi, fibrine...) permet, après enrichissement des cellules, d'injecter un grand nombre de CSMs dans un petit volume, tout en apportant des substances permettant de modifier l'environnement (augmentation de la viscosité, facteurs de croissance...). Les matrices sont des supports biodégradables (polymères dont la gélatine, le collagène...) favorisant la néovascularisation, la migration et l'attachement des cellules et la production de MEC (Pountos *et al.* 2007).

La thérapie par les CSMs a été utilisée pour d'autres affections myoarthrosquelettiques chez le Cheval, soit expérimentales comme le modèle de défaut cartilagineux dans le grasset (Wilke *et al.* 2007), soit cliniques comme la desmite du ligament suspenseur du boulet (Clegg 2008; Herthel 2001; Rosenbrock *et al.* 2004), avec des résultats encourageants.

	ESPÈCE	MODÈLE	RÉSULTATS	RÉFÉRENCES
EXPÉRIMENTAL	Rat	Rupture tendon d'Achille : gel de collagène + CSMs (moelle osseuse)	Propriétés mécaniques du tissu de cicatrisation deux fois supérieures au contrôle et structure mieux organisée	(Young <i>et al.</i> 1998)
		Ténectomie tendon flexor digitorum profundus (FDP) : gel de collagène + CSMs (moelle osseuse)	Amélioration significative des propriétés structurales du tendon	(Awad <i>et al.</i> 1999)
	Lapin	Tendon bioartificiel : CSMs (moelle osseuse + forces biomécaniques + environnement adéquat	Différentiation des CSMs en ténocytes	(Zhang and Chang 2003)
		Fenêtre dans tendon patellaire : éponge de collagène + CSMs	Alignement cellulaire comparable à un tendon normal ; Propriétés biomécaniques inférieures à la normale mais supérieures à une simple guérison	(Juncosa-Melvin <i>et al.</i> 2006)
		Transsection tendon d'Achille : suture immédiate + CSMs (moelle osseuse)	Morphométrie nucléaire et organisation du collagène meilleure 3 semaines avec CSMs mais aucune différence significative après 12 semaines Meilleures propriétés biomécaniques à trois semaines post chirurgie.	(Chong <i>et al.</i> 2007)
		Ténectomie (FDP) : suture d'un explant de tendon avec CSMs (moelle osseuse) ou CSMs de tissu adipeux ou fibroblastes ou ténocytes	Production de collagène, remodelage de la matrice extracellulaire Prolifération supérieure des CSMs de tissu adipeux versus ténocytes	(Kryger <i>et al.</i> 2007).
		Tendinite aux collagénases : cellules dérivées du tissu adipeux	Pas de différence avec le contrôle à l'échographie mais amélioration significative de l'architecture des fibres tendineuses (réduction inflammation, formation de collagène III)	(Nixon <i>et al.</i> 2008)
		Tendinite aux collagénases : CSMs (moelle osseuse) ou CSMs transfectées (gène IGF-I)	Amélioration significative des caractéristiques histologiques avec CSMs ou CSMs transfectées par rapport au contrôle	(Schnabel <i>et al.</i> 2009)
CLINIQUE	Cheval	Tendinite naturelle du TFSD (lésion centrale) + CSMs (n=11 chevaux de course)	Tendon guéri avec CSMs (versus fibrose dans le groupe contrôle) à 6 mois selon échographie, retour au même niveau de compétition après 9 à 12 mois, toujours actifs après 2 ans Pas d'effet secondaire lié à l'implantation des CSMs	(Pacini <i>et al.</i> 2007)
		Tendinite naturelle : CSMs (moelle osseuse) (n=215, suivi sur 61)	Lésions modérées à sévères : retour en course 51 % des chevaux si traités avec CMS versus 31 % si traitement conservateur. Taux de récidence : respectivement 30% contre 56 % (chevaux de même catégorie)	(Smith 2007).

Tableau IV : Principaux résultats des études portant sur l'utilisation des cellules souches pour la guérison du tendon

Les éléments-clé pour la réussite d'une régénération tissulaire sont au nombre de 4 et agissent en synergie (Richardson *et al.* 2007) :

- le support, apportant la protection et les éléments nutritifs,
- des facteurs anaboliques,
- un environnement mécanique approprié,
- une source de cellules.

Compte tenu de la pathophysiologie des lésions de tendinite chez le Cheval, il faut souligner que le tendon endommagé procure un support naturellement fermé (figure 17) favorable à l'implantation des CSs et un apport sanguin relativement convenable fournissant aux cellules un apport nutritionnel adéquat. Ces caractéristiques font du tendon équin un bon candidat pour thérapie cellulaire (Richardson *et al.* 2007).

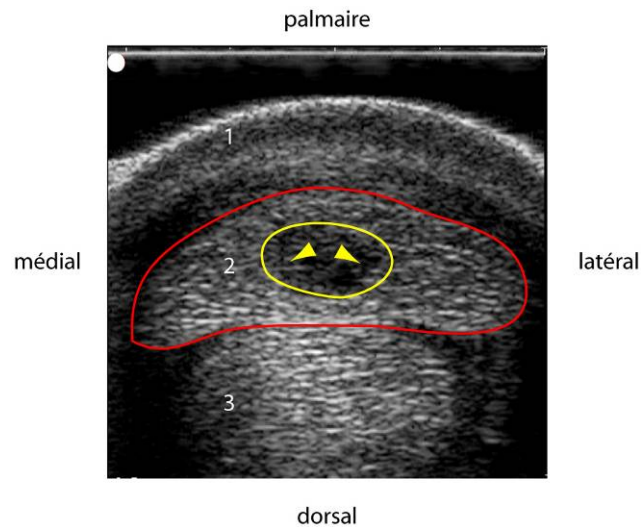


Figure 17 : Lésion centrale de tendinite du tendon fléchisseur superficiel du doigt chez un Cheval

D'après (Schramme *et al.* 2006)

1= tissu sous cutané ; 2= tendon fléchisseur superficiel du doigt (TFSD), dont le contour est délimité par la ligne rouge ; 3= tendon fléchisseur profond du doigt (TFPD). La lésion (délimitée par la ligne jaune) est entourée de tissu sain formant un espace clos. Lors du processus de guérison, le tissu de granulation (flèches jaunes) joue un rôle de support pour les cellules. Ces conditions sont particulièrement favorables à l'implantation des CSMs.

1.4.6 Protocole pour thérapie

A ce jour, aucun protocole n'a été clairement défini en termes de quantité optimale de cellules à injecter, de nombre d'injections et d'intervalles entre les injections pour obtenir une régénération tendineuse.

Le nombre de CSMs à utiliser pour traiter des tendinites est généralement extrapolé à partir des données disponibles chez le Lapin. Dans cette espèce, diverses concentrations de CSMs (1 , 4 et 8×10^6 cellules/mL de matrice de collagène de type I) améliorent la réparation tendineuse, mais pas de façon dose-dépendante, et des formations osseuses ectopiques sont observées dans près de 30 % des cas (Awad *et al.* 1999; Ringe *et al.* 2002).

Chez le Cheval, dans un modèle de tendinite induite par les collagénases, les auteurs utilisent environ 10^7 cellules dans le cadre d'une injection intra-lésionnelle (Schnabel *et al.* 2009; Smith *et al.* 2003). Dans le cadre de tendinites cliniques, Richardson *et al.* proposent 10×10^6 à 50×10^6 cellules en fonction de l'étendue de la lésion (Richardson *et al.* 2007). Cependant, une injection intra-lésionnelle avec une quantité inférieure à 10^6 cellules ne permet pas la cicatrisation du tendon (Pacini *et al.* 2007). La dose actuellement couramment utilisée est de 10^6 cellules (Smith 2008a). Aucune réaction, augmentation de taille ou formation de tissu anormal ou tumoral n'ont été observées avec des doses allant de $0,6 \times 10^6$ à $31,2 \times 10^6$ CSMs (Pacini *et al.* 2007; Smith *et al.* 2003). Aucune étude ne précise le moment optimal d'implantation des CSs. Il faut cependant noter que la présence d'un tissu fibreux mature peut être préjudiciable à l'implantation des CSs. Le moment opportun serait donc avant la formation du tissu fibreux, mais après la phase initiale d'inflammation (Richardson *et al.* 2007), c'est-à-dire dans le premier mois et idéalement pas plus tard que deux mois suivant la lésion (Smith 2008b).

1.5 Hypothèses et objectifs

Le premier objectif est de déterminer le protocole d'isolement des CSMs de moelle osseuse le plus adéquat pour l'utilisation en thérapie cellulaire équine parmi les trois techniques décrites (adhérence au pétri, gradient de Percoll® et gradient de Ficoll®). Nos hypothèses seraient que l'utilisation d'un gradient de densité permettrait d'obtenir des CSs plus concentrées qu'avec la technique classique et en plus grand nombre au terme du premier passage et que ces différentes techniques pourraient être à l'origine d'une sélection de sous populations de cellules différentes en fonction du protocole utilisé.

Le deuxième objectif est d'élaborer un modèle minimal invasif de guérison tendineuse afin d'évaluer les effets d'un traitement par les CSMs. Notre hypothèse est qu'un tel traitement serait capable de restaurer la microanatomie du tendon, d'améliorer sa résistance et de minimiser la quantité de tissu cicatriciel.

Le but à long terme est de démontrer que la thérapie par les CSMs résulte en un tissu de meilleure qualité que le tissu cicatriciel grâce à des tests biomécaniques (fonction) et des analyses histologiques et biochimiques.

Chapitre 2 : article

Présentation sous forme d'article.

Article accepté pour publication dans la revue Equine Veterinary Journal en octobre 2009.

**Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison
between 3 protocols**

Céline Bourzac, DMV, IPSAV

Lawrence C. Smith, DVM, M.Sc, PhD †

Patrick Vincent, PhD

Guy Beauchamp, PhD

Jean-Pierre Lavoie, DMV, Dipl ACVIM*

Sheila Lavery, DMV, Dipl. ACVS, Dipl ECVS*

* Département de Sciences Cliniques

† Département de Biomédecine vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada

Key words: Stem cells, Multipotent stromal cells, Percoll, Ficoll, density gradient separation, horse

2.1 Abstract

Reason for performing the study: There is a need to assess and standardize equine bone marrow (BM) mesenchymal stem cell (MSC) isolation protocols in order to permit valid comparisons between therapeutic trials at different sites.

Objective: To compare 3 protocols of equine BM MSC isolation; adherence to a plastic culture dish (Classic) and two gradient density separation protocols (Percoll and Ficoll).

Materials and methods: BM aspirates were harvested from the sternum of 6 mares and MSCs isolated by all 3 protocols. The cell viability after isolation, MSC yield, number of MSCs attained after 14 days of culture and the functional characteristics (self-renewal (CFU) and multilineage differentiation capacity) were determined for all 3 protocols.

Results: The MSC yield from the Percoll protocol was significantly higher ($6.8 \pm 3.8\%$) than the Classic protocol ($1.3 \pm 0.7\%$). The mean (\pm SD) number of MSCs recovered after 14 days culture per 10 mL BM sample was $24.0 (\pm 12.1)$, $14.6 (\pm 9.5)$ and $4.1 (\pm 2.5)$ million for the Percoll, Ficoll and Classic protocols respectively and was also significantly higher for the Percoll compared with the Classic protocol. Importantly, no significant difference in cell viability or in osteogenic or chondrogenic differentiation was identified between the protocols. At passage 0, cells retrieved with the Ficoll protocol had lower self-renewal capacity when compared with the Classic protocol but there was no significant difference between protocols at passage 1. There were no significant differences between the 3 protocols for the global frequencies of CFUs at P0 or at P1.

Conclusions and clinical relevance: These data suggest that the Percoll gradient density separation protocol was the best in terms of MSC yield and self-renewal potential of the MSCs retrieved and that MSCs retrieved with the Ficoll protocol had the lowest self-renewal but only at passage 0. Then, the 3 protocols were equivalent. However, the Percoll protocol should be considered for equine MSC isolation to minimize culture time.

2.2 Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs), also known as multipotent stromal cells or mesenchymal progenitor cells (Dominici *et al.* 2006) are of increasing interest in the regenerative medicine field. They represent a heterogeneous population of highly proliferative cells, with a characteristic of self-renewal and *in vitro* multilineage differentiation capacity (Fortier 2005; Pittenger *et al.* 1999). They can differentiate into lineages of mesenchymal tissues, such as bone, cartilage, adipose tissue (AT), muscles and tendon (Tuan *et al.* 2003). Although it was originally believed that they participate in tissue homeostasis by replacing damaged or senescent cells, it is now postulated that they contribute to healing by playing a trophic role, producing cytokines and growth factors (Caplan 2009).

Equine MSCs have now been evaluated for their therapeutic potential in a variety of experimental models of musculoskeletal injury: articular cartilage (Frisbie *et al.* 2009; Wilke *et al.* 2007) and tendon (Del Bue *et al.* 2008; Guest *et al.* 2008; Nixon *et al.* 2008; Schnabel *et al.* 2009; Violini *et al.* 2009). Furthermore, they are currently employed in cell therapy to enhance repair in horses with clinical tendinitis (Smith 2008a; Smith 2008b; Smith *et al.* 2003) or suspensory ligament desmitis (Clegg 2008; Herthel 2001; Rosenbrock *et al.* 2004), as these conditions are difficult to treat because of poor intrinsic healing quality in these tissues in adult horses. Preliminary results are promising.

Several tissue sources of equine MSCs such as bone marrow (BM) (Arnhold *et al.* 2007; Fortier *et al.* 1998; Koerner *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2006; Violini *et al.* 2009), AT (Del Bue *et al.* 2008; Nixon *et al.* 2008; Vidal *et al.* 2007), peripheral blood (Koerner *et al.* 2006) and umbilical cord blood (Koch *et al.* 2007; Reed and Johnson 2008) have been investigated. For practical reasons, the most common harvest method employed clinically is BM or AT harvest, although umbilical cord blood banks are rapidly expanding. BM-MSCs are easy to harvest, isolate and expand but pneumopericardium is a potential severe, but rarely reported, complication (Durando *et al.* 2006). AT- MSCs are also easy to harvest but require a more invasive standing surgical procedure. AT yields a greater quantity of MSCs per volume without expansion when compared to BM, but their osteogenic and chondrogenic differentiation capacity has been reported to be lower and they are less

studied than BM-MSCs (Colleoni *et al.* 2009; Kisiday *et al.* 2008; Vidal *et al.* 2007; Vidal *et al.* 2008).

In humans, BM-MSCs are currently under investigation in clinical trials to treat patients with acute myocardial infarction (Assmus *et al.* 2002; Janssens *et al.* 2006; Schachinger *et al.* 2006; Wollert *et al.* 2004) with variable success rates reported to date. A recent study comparing different BM-MSC isolation protocols demonstrated that cell numbers and viability were not sufficient parameters to assess the quality of cells retrieved, as even small changes in protocols could affect the functional capacity of cells. Thus, they postulated that the clinical outcome after MSC therapy could also be affected by the cell isolation protocol (Seeger *et al.* 2007). These findings highlight the need to assess and standardize equine MSC isolation protocols before embarking on therapeutic trials in order to compare results at different sites. Relatively little information has been reported on equine MSCs to date and information has been extrapolated from what is known in other species.

Three equine BM-MSC isolation protocols have been described in the literature to date. The first, referred to as Classic protocol herein, is based on MSC capacity to adhere to plastic culture dishes (Arnhold *et al.* 2007; Fortier *et al.* 1998). Mononuclear cells (MNCs, including MSCs) contained in BM are plated on plastic culture dishes and allowed to attach for 5 days. When the culture medium is changed, the non-adherent hematopoietic cells are removed. After 14 days expansion, adherent MSCs are detached (Arnhold *et al.* 2007; Fortier *et al.* 1998). Density gradient solutions separate the MNC fraction from the red blood cells, granulocytes, platelets and myeloid immature precursors (Fortier 2005; Lennon and Caplan 2006; Pountos *et al.* 2007). The BM sample is placed on a density column and, following centrifugation, MNCs are harvested at the interface between the plasma and gradient density solution bands (Figure 1). A Ficoll solution (polysaccharide solution, density of 1.077) has been frequently used for BM-MSC isolation (Pacini *et al.* 2007; Smith 2008b; Smith *et al.* 2003; Vidal *et al.* 2006). However, a Percoll solution (colloidal solution of silica particles, density of 1.084-1.088) has also been recently employed in studies to isolate equine MSCs (Colleoni *et al.* 2009; Hegewald *et al.* 2004; Wilke *et al.* 2007).

The objective of the present study was to compare 3 protocols for equine BM-MSC isolation, the Classic protocol and 2 gradient density protocols (Percoll and Ficoll), by

evaluating MSC yield and the functional characteristics (self-renewal and differentiation capacity) of the retrieved population. It was hypothesized that the gradient density protocols would allow recovery of a higher number of MSCs than the Classic protocol and that MSC functional characteristics would be affected by the isolation protocol used.

2.3 Materials and methods

The experimental protocol was approved by the institutional animal care and use committee.

2.3.1 Animals

BM aspirates were obtained from healthy Standardbred mares (n=6) from a research herd with a mean (\pm SD) age of 6.4 (\pm 4.7) years and weighing between 400 and 550 kg. They were kept in pasture and had not been used for other research projects for at least 5 months prior to the experiment.

2.3.2 BM harvest

BM aspirates were obtained as previously described (Orsini and Divers 1998). Horses were sedated and the sternum was aseptically prepared. Under local anesthesia, four 10 mL samples of BM were collected, using a Jamshidi biopsy needle¹ in syringes preloaded with 1000 IU heparin². Horses were administered TMS³ (5 mg/kg, PO) and phenylbutazone⁴ (2.2 mg/kg, PO) prophylactically 1 hour before the procedure.

2.3.3 MSC isolation

A 20 mL sample was allocated to the Classic protocol and a 10 mL sample each to the Percoll and Ficoll separation techniques. The experimental protocol is outlined in Figure 2.

2.3.3.1 Classic protocol

The BM samples were centrifuged⁵ at 1 000 g for 15 minutes. The supernatant was aspirated and the pellet was washed twice with PBS⁶ (modified from (Fortier *et al.* 1998)). Following centrifugation and resuspension in 10 mL of culture medium (DMEM low glucose with pyruvate⁷, 10% FBS⁸ and 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B and fungizone⁹), 20 μ L aliquots of MNC (containing MSCs) were counted using a haemocytometer (magnification x10). Viability of the MNCs was determined by trypan blue dye staining¹⁰ (Strober 2001). MNCs were then plated in 100 mm plastic culture dishes¹¹ at a cell density of $1.2 \times 10^6/\text{cm}^2$ with 10 mL of culture medium ($0.13 \text{ mL}/\text{cm}^2$).

2.3.3.2 Density Gradient separation (Percoll or Ficoll)

After centrifugation at 1 000 g for 15 minutes, the supernatant was aspirated and the pellet was resuspended in culture medium to attain either a 2 x 5 mL (Percoll, in polycarbonate tubes¹²) or 15 mL (Ficoll, in a polypropylene tube¹³) stock cell solution and were layered over two 7 mL pre-formed continuous Percoll¹⁴ or a 7 mL Ficoll¹⁵ density gradients respectively. They were centrifuged at 400 g for 25 min at 20°C. The MSC-enriched MNC population was then aspirated with a Pasteur pipette (approximately 1.5 and 1 mL for the Percoll and the Ficoll respectively) and washed in culture medium by further centrifugation at 350 g for 10 min at 20°C (modified from (Hegewald *et al.* 2004; Smith *et al.* 2003)). The pellets were resuspended in 10 mL of culture medium. Then, 20 µL aliquots were aspirated for MNC counts. Viability of the MNCs was determined as described above. MNCs were then plated in 100 mm plastic culture dishes at a cell density of 200 000/cm² (0.13 mL/cm²).

In each protocol, cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, allowed to attach for 5 days and then, the medium was changed every 2 days. After 80-90% confluence was reached (14 days for each group), adherent cells were washed twice in PBS, trypsinized¹⁶ (passage 1) and centrifuged at 350 g for 10 min at 20°C. Cells were then resuspended in 10 mL of culture medium. A 20 µL aliquot was aspirated and MSCs were counted.

2.3.4 Protocol MSC yield

With all the three protocols, as all cells were not plated for culture, the adjusted number of MSCs recovered was calculated by multiplying the cell yield of the protocol by the total number of MNCs in a 10 mL BM sample. As density gradient protocols involved 2 steps, the MSC yield was calculated as the multiplication of cell yield of step 1 and step 2 (Figure 3).

2.3.5 Colony-Forming Unit (CFU) assays

A CFU limit dilution assay assesses the potential for cell self-renewal (a stem cell's capacity to divide into one daughter cell which remains in an undifferentiated stem-like state and one daughter cell which differentiates into a more specific cell (Dennis and Caplan 2004)). Each colony derives from the division of a single cell (Friedenstein *et al.* 1974). CFU assays were performed at passage 0 (P0 = cells retrieved from the BM and

cultured before trypsinization) and passage 1 (P1 = cells retrieved from the first trypsinization), in 100 mm plastic culture dishes in triplicate. As a lower frequency of MSCs was anticipated at P0, MNCs were plated at a higher density than at P1. At P0, MNCs were seeded at densities of 5×10^4 and 10^4 cells per plastic culture dish, and incubated in culture medium as described above. After 14 days, adherent cells were washed twice in PBS, fixed and stained with 1% crystal violet¹⁷ in 10% ethanol for 10 min. CFUs per plate were counted macroscopically and the mean of triplicate dishes was recorded for each of the densities.

The frequency of CFU at P0 was estimated by dividing the number of CFUs with the number of MNCs plated and expressed as a percentage. The global frequency of CFUs at P0 was determined for each protocol as the mean of the frequency of CFUs for the different densities (Arnhold *et al.* 2007).

At P1, the seeding densities were 100, 50 and 10 cells per plastic culture dish. They were incubated and then washed, fixed, stained and CFUs, frequency of CFUs and global frequency of CFUs at P1 determined as described at P0.

2.3.6 Trilineage cell differentiation

Tri-lineage cell differentiation (osteocyte, chondrocyte and adipocyte) is a standard method for identification of MSCs and stemness *in vitro* (Dominici *et al.* 2006). For each differentiation assay, P1-MSCs in a control group (unstimulated cells) and differentiation group (stimulated cells) were seeded in a 6-well plate, in duplicates. The control groups were cultured with culture medium described above.

2.3.6.1 Osteogenesis assay

An osteogenesis assay was performed as described previously with minor adjustments (Tondreau *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2005). P1-MSCs were plated at a density of 3×10^3 cells/cm². At 24 hours, osteogenic differentiation was induced in culture medium supplemented with 0.1 μ M dexamethasone¹⁸, 10 mM β -glycerophosphate¹⁹ and 0.1 mM ascorbic acid²⁰ (0.40 mL/cm²) for 7 days. Cells were then fixed in 70% ethanol for 10 min at -20°C and stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-nitro blue tetrazolium²¹ for 5 min for the detection of alkaline phosphatase (ALP) activity (Arnhold *et al.* 2007).

2.3.6.2 Chondrogenesis assay

A chondrogenesis assay was performed as described previously (Ahrens *et al.* 2004). P1-MSCs were plated at the density of 5×10^3 cells/cm². When they reached 80% confluence, chondrogenic differentiation was induced in culture medium supplemented with 10 ng/mL TGF- β 1²² and 100 nM dexamethasone (0.40 mL/cm^2) for 7 days. Cells were then fixed and stained with 0.8% toluidine blue²³ for 4 min for the detection of highly sulphated proteoglycans (Arnhold *et al.* 2007).

2.3.6.3 Adipogenesis assay

An adipogenesis assay was performed as previously described (Wagner *et al.* 2005). P1-MSCs were plated at the density of 3×10^3 cells/cm². When they reached 100% confluence, cells were cultured in induction medium (culture medium supplemented with 1 μ M dexamethasone, 60 μ M indomethacin²⁴, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin²⁵ and 10 μ g/mL recombinant human insulin²⁶, 0.40 mL/cm^2) for 2 days followed by maintenance medium (culture medium, with 10 μ g/mL insulin, (0.40 mL/cm^2) for 4 days. After 3 cycles of induction/maintenance, cells were fixed with 10% neutral buffered formalin for 10 min, then stained with 0.5% oil red O²⁷ in isopropyl alcohol: distilled water (60:40) for 30 min for the detection of neutral lipid droplets (Arnhold *et al.* 2007).

After staining, for each differentiation assay, in all the 3 protocols of MSC isolation, images of 10 random fields in each of 2 plates of the differentiation group (magnification x20) were acquired. Positive stained areas were measured in each field using NIH Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) (Rangan and Tesch 2007). The 10-field areas were added in each plate and the mean of the 2 plates was recorded. After reviewing images of osteogenic differentiation, cells were seen to aggregate in nodules or rows. Positive stained rows and nodules were counted in the 10 random fields in each 2 plates and overall percentages of positive stained rows and nodules were determined.

2.3.7 Statistical analysis

For comparisons between the 3 methods, a repeated-measures linear model with the protocol (Classic, Percoll, Ficoll) as within-subject factor was used. Post-hoc Tukey's test was employed when a significant difference was determined for the model. For comparisons between P0 and P1, a double repeated-measures linear model with the protocol and time (P0 and P1) as within-subject factors was used. Statistical significance

was set at a value of $p \leq 0.05$. All statistical analysis was performed with SAS v.9.1 (Cary, N.C.).

2.4 Results

2.4.1 MSC isolation

The total number (mean (\pm SD)) of MNCs in an untreated 10 mL BM sample was 360 (\pm 114) million (Table I).

The total number of MNCs recovered from a 10 mL BM sample, immediately after density gradient separation protocols, was significantly lower compared to naive BM samples ($p < 0.0001$). The total MNC numbers recorded were 119 (\pm 68) $\times 10^6$ for the Percoll protocol and 103 (\pm 62) $\times 10^6$ for the Ficoll protocol but this difference was not significant (Table I).

2.4.2 Protocol MSC yield

The MSC yield was significantly higher with the Percoll protocol (6.8 (\pm 3.8) %), but not the Ficoll protocol (4.2 (\pm 3.1) %), compared to the Classic protocol (1.3 (\pm 0.7) %) ($p = 0.005$ and $p = 0.1$ respectively). No significant difference was detected between the density gradients methods (Table I).

The number of MSCs recovered after 14 days of culture was 4.1 (\pm 2.5), 24.0 (\pm 12.1) and 14.6 (\pm 9.5) $\times 10^6$ for the Classic, Percoll and Ficoll protocols respectively. The difference was statistically significant for Percoll vs. Classic ($p = 0.004$) but not for Percoll vs. Ficoll or Ficoll vs. Classic methods.

Interestingly, the expansion yield (step 2 yield; Figure 3) was significantly higher with the Percoll protocol compared to the Ficoll protocol (25.3 (\pm 15.5) % and 16.9 (\pm 11.4) % respectively, $p = 0.04$).

Cell viability was similar with all three isolation protocols (Table I).

2.4.3 CFU assays

CFU assays were successful in 5 and 6 horses at P0 and P1, respectively. No result was obtained in one horse at P0 because of a probable contamination in plastic culture dishes leading to cell death.

The self-renewal capacity of MSCs isolated with the Ficoll protocol was significantly lower than that of MSCs isolated with the Classic protocol at P0 (density of

50,000 cells/plastic culture dish, $p=0.02$ for both number and frequency), but was similar between the three protocols at P1 (Figure 4).

There were no significant differences between the 3 protocols for the global frequencies of CFU at P0 or P1 (Table II). The global frequency of CFUs at P1 was higher than at P0 for all 3 protocols, as the MSC population was enriched by passage. However this difference was only significant within the Classic ($p=0.0005$) and the Percoll protocols ($p=0.0004$) (Table II).

2.4.4 Trilineage differentiation

2.4.4.1 Osteogenic differentiation capacity

Osteogenic differentiation was observed in the 5 horses (Figure 5a).

Quantitative determination of ALP positive-stained cell areas, the percentage of positive-stained nodules or the percentage of positive stained rows revealed no significant differences between protocols (Figure 5d).

2.4.4.2 Chondrogenic differentiation capacity

Chondrogenic differentiation was observed in the 5 horses (Figure 5b).

Quantitative determination of toluidine blue-stained cell areas revealed no significant differences between protocols (Figure 5d). Stained cell area was however greater in the osteogenic compared to the chondrogenic assays as cells aggregated into dense nodules in chondrogenic assays, as opposed to both nodules and larger rows in the osteogenic assays (Figure 5a and 5b, right panel).

2.4.4.3 Adipogenic differentiation capacity

The initial protocol employed did not yield satisfactory adipogenesis. We subsequently repeated the protocol described earlier, but employing 15% rabbit serum (Janderova *et al.* 2003) using BM aspirates from 2 additional horses. Satisfactory adipogenesis was attained (Figure 5c) but as the numbers of horses were inadequate, a statistical comparison was not made.

2.5 Discussion

The major finding of this study is that the number of MSCs recovered following *in vitro* expansion of equine bone marrow aspirates is significantly affected by the isolation protocol employed. The number of colony forming units (CFUs) is also significantly affected by protocol choice but, importantly, from a clinical perspective, functional, or at least differentiation capacity, does not appear to be affected by the isolation method selected.

Specifically, the number of MSCs recovered 14 days post-culture, combined with CFUs were isolation-protocol dependent. Although the number of MSCs recovered with gradient density protocols was higher than with the Classic protocol, only the Percoll protocol resulted in a significantly higher number of MSCs compared to the Classic protocol (an approximate 6 fold increase in yield). These findings could be explained by the difference in cell seeding methods: first, the MNCs in the Classic protocol were seeded at a higher density than in the density gradient protocols which could alter behaviour in culture; second, “contaminant” cells such as red blood cells, granulocytes, platelets and myeloid precursors are present with the former technique (Fortier 2005; Lennon and Caplan 2006; Pountos *et al.* 2007), which could potentially impair MSC multiplication. We were faithful to harvest and expansion methods previously described in the literature, as our goal was to compare the currently employed methods for future practical applications.

Although the difference was not significant, the number of MNCs retrieved with the Percoll protocol was higher than with the Ficoll protocol. The Percoll and Ficoll solutions investigated differ in density: 1.088 and 1.077 respectively. Consequently, we postulate that some MNCs may have separated in the Ficoll gradient solution at sites other than the harvested site. Thus, it would be of interest to quantify and characterize MNCs recovered in each of the bands of the gradients to determine if they are mainly MSCs and confirm this hypothesis.

The CFUs in the Ficoll protocol were less numerous than in the Classic protocol at P0. This was confirmed by the significantly lower expansion yield of the Ficoll protocol compared to the Percoll protocol at P0. Our findings corroborate a previous investigation of protocols to separate MSCs from human BM, comparing Percoll and Ficoll as it was also similarly reported that the number of CFUs were higher with the Percoll protocol compared

to the Ficoll protocol (Georgiou *et al.* 1983). In the latter study however, a discontinuous Percoll gradient was used and the Percoll solution density was lower than that of the Ficoll. Similar numbers of CFUs were also obtained by others with both Percoll and Ficoll associated with metrizoate sodium (Vannier *et al.* 1980). As Percoll and Ficoll solutions differ in composition, we postulate that the Ficoll solution could diminish or retard their capacity to multiply when compared to Percoll but this needs to be investigated further.

The number of colonies in the CFU assay at P1 was higher than the number of cells that were seeded, particularly with Classic and Percoll protocols. An explanation may be mechanical disruption of colonies induced by culture medium changes. Some MSCs may unstick and subsequently adhere, and create new satellite colonies (clonicity is an inherent property of MSCs), though this remains to be proven. This could also explain the significant difference in global frequencies of CFUs identified between P0 and P1 with the Classic and Percoll protocols compared to the Ficoll protocol. At P1, although the global frequency of CFU in the Percoll protocol was more than twice the Ficoll protocol, the difference was not significant. As our statistical power was good, this means that the effect of the isolation protocol on MSC multiplication capacity is lost at P1.

In the present study, MSC characterisation was based on adherence to plastic culture dishes, CFU numbers and trilineage differentiation. Satisfactory adipogenesis was attained with the use of 15% rabbit serum in the differentiation medium. Although adipogenic differentiation of BM-MSCs has been achieved (Arnhold *et al.* 2007; Fortier *et al.* 1998) without the addition of rabbit serum in the horse, numerous other studies have reported that it is required to achieve reliable adipogenic differentiation of BM, umbilical cord blood and AT MSCs (Koch *et al.* 2007; Reed and Johnson 2008; Vidal *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2007). Rabbit serum has also been found to enhance adipogenesis in BM-MSC *in vitro* in humans (Diascro *et al.* 1998; Houghton *et al.* 1998; Janderova *et al.* 2003), and rodents (Diascro *et al.* 1998).

Importantly, cell viability and differentiation to osteocytes and chondrocytes was similar between the 3 protocols. From a functional perspective, where cell therapy for musculoskeletal conditions is the clinical goal, it is intuitively important that they do not lose, or have reduced capacity to differentiate, as it would seem a desirable property for tissue regeneration goals. However, as it has also been hypothesized that stem cells' principal role in healing is to provide trophic factors (Caplan 2009) to enhance healing, the

ability to differentiate may not be an essential character of these cells in respect to enhancing healing.

Additional studies assessing gene expression (Menicanin *et al.* 2009) and proteomic profiles (Mareddy *et al.* 2009) of these cells would be required to determine if cell function is altered by the isolation protocols. Cell migration capacity in response to cytokines is also an important step in the healing process and it has been recently reported that MSC migration capacity is impaired *in vitro* by the protocol used to isolate cells (Seeger *et al.* 2007). This illustrates and underpins that isolation protocols have the potential to alter important functional aspects of the cell therapy healing process and should be taken into consideration when choosing protocols.

Although MSCs hold great promise for future stem cell-based therapeutic strategies and indeed are currently employed clinically in equine athletes, further research is required to understand their mechanisms of action in order to effectively dose and enhance these effects. There remains a huge knowledge gap in this field, as there is still a lack of rigorous definitions, characterisation and standardisation to permit meaningful comparisons to be made between sites. Important essential knowledge is consequently lacking on how to tailor therapy.

In conclusion, this study of 3 different protocols to isolate equine MSCs has shown that the Percoll protocol had the highest MSC yield and a better self-renewal capacity when compared to the Ficoll protocol. MSCs retrieved with the Ficoll protocol had the lowest self-renewal potential at passage 0. Importantly, no difference in differentiation capacity was shown between the 3 protocols. For these reasons, a Percoll isolation protocol should be considered for equine MSC isolation.

2.6 Footnote

- ¹ Original Jamshidi needle: Cardinal Heath Canada, Vaughan, Ontario, Canada
- ² Heparin LEO: McKesson Canada, Saint Laurent, Quebec, Canada
- ³ Novotrimel: Novopharm Animal Health, Scarborough, Ontario, Canada
- ⁴ Phenylbutazone: Professional Veterinary Laboratories, Winnipeg, Manitoba, Canada
- ⁵ Allegra™ X-12 R centrifuge, Beckman Coulter
- ⁶, ⁷, ⁸: Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
- ¹⁰, ¹⁷, ¹⁸, ¹⁹, ²⁰, ²², ²³, ²⁴, ²⁵, ²⁶, ²⁷: Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada
- ¹¹, ¹³ Sarstedt Inc., Quebec, Canada
- ⁹ Antibiotic-Antimycotic: Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
- ¹² Nalge Nunc International, Rochester, USA¹⁴ Percoll: VWR International, Ville Mont Royal, Quebec, Canada
- ¹⁵ Ficoll Paque Plus: VWR International, Ville Mont Royal, Quebec, Canada
- ¹⁶ Trypsin 0.25%: Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
- ²¹ Fisher Scientific Company, Ottawa, Ontario, Canada

2.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Kathleen Thérout, Pascal Fontaine, Nadine Bouchard and Hélène Richard for technical assistance. Sheila Laverty is funded by the Canadian Arthritis Network (CAN) National Sciences & Engineering Research Council (NSERC) & the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Canada.

2.8 References

- Ahrens, N., Tormin, A., Paulus, M., Roosterman, D., Salama, A., Krenn, V., Neumann, U. and Scheduling, S. (2004) Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation* **78**, 925-929.
- Arnhold, S.J., Goletz, I., Klein, H., Stumpf, G., Beluche, L.A., Rohde, C., Addicks, K. and Litzke, L.F. (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* **68**, 1095-1105.
- Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* **106**, 3009-3017.
- Caplan, A.I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* **217**, 318-324.
- Clegg, P.D. (2008) Biological therapies for treatment of tendon and ligament injuries. In: *British Equine Veterinary Association Congress 2008*, Liverpool.
- Colleoni, S., Bottani, E., Tessaro, I., Mari, G., Merlo, B., Romagnoli, N., Spadari, A., Galli, C. and Lazzari, G. (2009) Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary research communications*.
- Del Bue, M., Ricco, S., Ramoni, R., Conti, V., Gnudi, G. and Grolli, S. (2008) Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Veterinary research communications* **32 Suppl 1**, S51-55.
- Dennis, J.E. and Caplan, A.I. (2004) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem Cells Handbook*, Ed: S. Sell, Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 107-117.
- Diascro, D.D., Jr., Vogel, R.L., Johnson, T.E., Witherup, K.M., Pitzenger, S.M., Rutledge, S.J., Prescott, D.J., Rodan, G.A. and Schmidt, A. (1998) High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* **13**, 96-106.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317.

- Durando, M.M., Zarucco, L., Schaer, T.P., Ross, M. and Reef, V.B. (2006) Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine veterinary education* **182**, 75-79.
- Fortier, L.A. (2005) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* **34**, 415-423.
- Fortier, L.A., Nixon, A.J., Williams, J. and Cable, C.S. (1998) Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* **59**, 1182-1187.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A. and Ruadkow, I.A. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**, 83-92.
- Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M. and McIlwraith, C.W. (2009) Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res*.
- Georgiou, G.M., Robertson, D.M., Ellis, W.M., Shen, B.J., Ekert, H. and Hosking, C.S. (1983) CFU-c enrichment from human bone marrow using a discontinuous Percoll gradient and soybean agglutinin in comparison with Ficoll-paque. *Clin Exp Immunol* **53**, 491-496.
- Guest, D.J., Smith, M.R. and Allen, W.R. (2008) Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine veterinary journal* **40**, 178-181.
- Hegewald, A.A., Ringe, J., Bartel, J., Kruger, I., Notter, M., Barnewitz, D., Kaps, C. and Sitter, M. (2004) Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue & cell* **36**, 431-438.
- Herthel, D.J. (2001) Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. pp 319-321.
- Houghton, A., Oyajobi, B.O., Foster, G.A., Russell, R.G. and Stringer, B.M. (1998) Immortalization of human marrow stromal cells by retroviral transduction with a temperature sensitive oncogene: identification of bipotential precursor cells capable of directed differentiation to either an osteoblast or adipocyte phenotype. *Bone* **22**, 7-16.

- Janderova, L., McNeil, M., Murrell, A.N., Mynatt, R.L. and Smith, S.R. (2003) Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res* **11**, 65-74.
- Janssens, S., Dubois, C., Bogaert, J., Theunissen, K., Deroose, C., Desmet, W., Kalantzi, M., Herbots, L., Sinnaeve, P., Dens, J., Maertens, J., Rademakers, F., Dymarkowski, S., Gheysens, O., Van Cleemput, J., Bormans, G., Nuyts, J., Belmans, A., Mortelmans, L., Boogaerts, M. and Van de Werf, F. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **367**, 113-121.
- Kisiday, J.D., Kopesky, P.W., Evans, C.H., Grodzinsky, A.J., McIlwraith, C.W. and Frisbie, D.D. (2008) Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* **26**, 322-331.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D. and Betts, D.H. (2007) Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC biotechnology* **7**, 26.
- Koerner, J., Nesic, D., Romero, J.D., Brehm, W., Mainil-Varlet, P. and Grogan, S.P. (2006) Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 1613-1619.
- Lennon, D.P. and Caplan, A.I. (2006) Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **34**, 1604-1605.
- Mareddy, S., Broadbent, J., Crawford, R. and Xiao, Y. (2009) Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **106**, 776-786.
- Menicanin, D., Bartold, P.M., Zannettino, A.C. and Gronthos, S. (2009) Genomic Profiling of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev.*
- Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E. and Ward, D.L. (2008) Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American journal of veterinary research* **69**, 928-937.
- Orsini, J.A. and Divers, T.J. (1998) Manual of Equine Emergencies: Treatment and Procedures, 1st edn., Ed: Saunders, Philadelphia, PA. pp 27-28.
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F. and Petrini, M. (2007) Suspension of Bone Marrow-Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses. *Tissue engineering*.

- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y)* **284**, 143-147.
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P. and Giannoudis, P.V. (2007) Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* **38 Suppl 4**, S23-33.
- Rangan, G.K. and Tesch, G.H. (2007) Quantification of renal pathology by image analysis. *Nephrology (Carlton)* **12**, 553-558.
- Reed, S.A. and Johnson, S.E. (2008) Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *Journal of cellular physiology* **215**, 329-336.
- Rosenbrock, A., Jacobi, R., Jaugstetter, H. and Brehm, W. (2004) Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses - A clinical case control study. In: *12th ESVOT Congress*, Eds: A. Vezzoni and M. Schramme, Munich.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., Suselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **355**, 1210-1221.
- Schnabel, L.V., Lynch, M.E., van der Meulen, M.C., Yeager, A.E., Kornatowski, M.A. and Nixon, A.J. (2009) Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*.
- Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **28**, 766-772.
- Smith, R.K. (2008a) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* **30**, 1752-1758.
- Smith, R.K. (2008b) Use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to enhance tendon and ligament healing. In: *Proceedings 2008 ACVS Veterinary Symposium: The surgical Summit 2008*, San Diego, California. pp 172-176.

- Smith, R.K., Korda, M., Blunn, G.W. and Goodship, A.E. (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal* **35**, 99-102.
- Strober, W. (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 3**, Appendix 3B.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D. and Lagneaux, L. (2005) Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 1105-1112.
- Tuan, R.S., Boland, G. and Tuli, R. (2003) Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy* **5**, 32-45.
- Vannier, J.P., Monconduit, M. and Piguet, H. (1980) [Comparison between 2 density gradients for separation of CFU]. *Biomedicine* **33**, 236-239.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Johnson, J.R., Lopez, M.J., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2006) Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* **35**, 601-610.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* **36**, 613-622.
- Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2008) Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* **37**, 713-724.
- Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C. and Mariani, P. (2009) Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* **10**, 29.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A.D. (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**, 1402-1416.

- Wilke, M.M., Nydam, D.V. and Nixon, A.J. (2007) Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* **25**, 913-925.
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. and Drexler, H. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-148.

2.9 Legends

Figure 1: Separation of mononuclear cells by density centrifugation in Percoll and Ficoll 5 mL (Percoll) or 15 mL (Ficoll) of bone marrow samples were layered over a 7 mL pre-formed continuous Percoll density gradient (in a polycarbonate tube) or a 7 mL Ficoll density gradient (in a polypropylene tube) respectively.

Figure 2: Experimental protocol timelines

Figure 3: MSC yield calculation for Classic and density gradient protocols (Percoll and Ficoll)

In the classic protocol, the MSC yield was calculated as the ratio of the number of MSCs recovered after 14 days of culture to the number of MNCs plated (14 day MSC count/number of MNC plated).

As density gradient protocols involved 2 steps (centrifugation of sample with a density gradient solution and expansion of the recovered cells after centrifugation), the MSC yield was calculated as the multiplication of cell yield of step 1 and step 2. Step 1: MNC separated/MNC in a 10 mL BM sample. Step 2: 14 day MSC count/ number of MNC plated).

Figure 4: Colony Forming Unit (CFU) assays for the three protocols of MSC isolation from a bone marrow sample

These images are representative of the mean (\pm SD) number and frequency of colonies obtained in CFU assays (A) at P0 (stained at day 14) and (B) at P1 (stained at day 28) (n=6 horses). Colonies were counted macroscopically and the mean of the triplicates was recorded for each of the densities in each horse. ¶ indicates statistically significant differences for Percoll or Ficoll protocols vs. classic protocol.

Figure 5: Multilineage differentiation of equine MSCs

These images are representative of multilineage differentiation of equine MSCs for each of the 3 protocols.

A) Osteogenesis and alkaline phosphatase activity staining. Cells transformed to a polygonal morphology and aggregated into nodules or rows that stained positive for ALP activity compared to the control group.

B) Chondrogenesis and toluidine blue staining. Cells aggregated into nodules that gradually increased in size over the 2 week culture period and stained positive for toluidine blue dye compared to the control group.

C) Adipogenesis and oil red O staining. Lipid droplets (stained in red) accumulated within the cytoplasm over the 3 week culture period. Adipogenesis was present in the control group (left panel) although it was inferior to the differentiation group.

Bars represented a scale of 400 μm .

D) Graph of positive stained areas measured with Image J software. There was no difference in multilineage differentiation capacities between the 3 MSC isolation protocols.

Tableau I: Summary of equine mononuclear cell (MNC) and mesenchymal stem cell (MSC) yield and kinetics obtained from bone marrow samples with different isolation protocols

	Classic protocol	Percoll protocol	Ficoll protocol	p-value
Recovery of MNC (x10⁶)	* 360 (± 114)	119 (± 68)¶	103 (± 62)¶	p<0.0001
MSC yield of the protocol (%)	1.3 (± 0.7)	6.8 (± 3.8)¶	4.2 (± 3.1)	p=0.005
Centrifugation yield of the protocol (%)		33.7 (± 16.8)	28.7 (± 15.9)	
Expansion yield of the protocol (%)		25.3 (± 16.0)§	16.9 (± 11.0)	p=0.04
Adjusted MSC number (from 10 mL BM sample) 14 days post culture (x10⁶)	4.1 (± 2.5)	24.0 (± 12.1)¶	14.6 (± 9.5)	p=0.004
Viability (%)	100	100	99 (± 1)	

Comparison of the MSC isolation protocols from a 10 mL bone marrow aspirate (n= 6 horses). Data are expressed as mean (± SD).

* The total number of MNC recovered in a 10 mL bone marrow sample was 360 (± 114) million.

¶ indicates statistically significant differences for Percoll or Ficoll protocols vs. classic protocol. § indicates statistically significant differences Percoll protocol vs. Ficoll protocol.

Tableau V: Global frequencies of CFU (%) at P0 and P1 for the Classic, Percoll and Ficoll protocols.

Passage	Classic	Percoll	Ficoll
P0	0.006 ± 0.005 ¥	0.005 ± 0.002 ¥	0.0009 ± 0.0006
P1	70 ± 20	73 ± 37	34 ± 24

This table summarizes the global frequencies of colony-forming unit (CFU) at passage 0 (P0, n=5) and passage 1 (P1, n=6). The global frequency of CFUs (%) was determined at each passage and for each protocol as the mean of the frequencies of CFUs for the different cell plating densities of the passage.

¥ indicates a statistically significant difference between the passages within a protocol.

Figure 18:

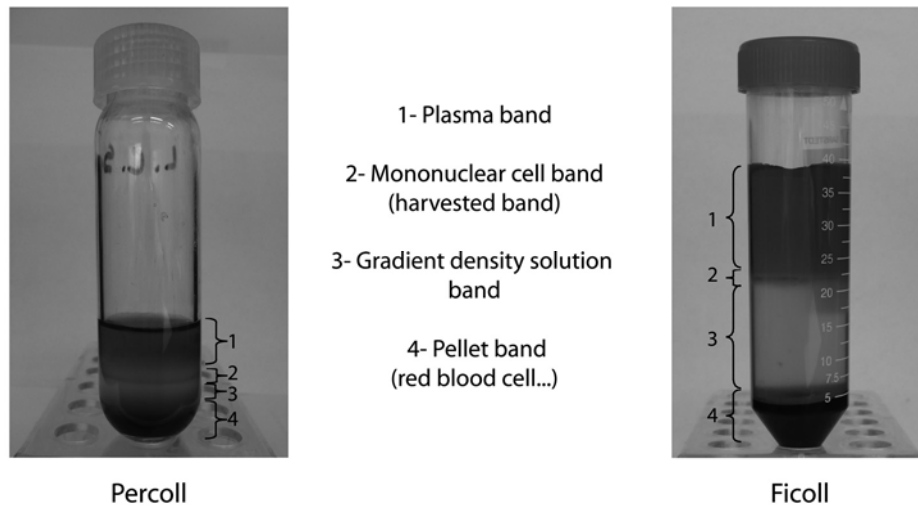


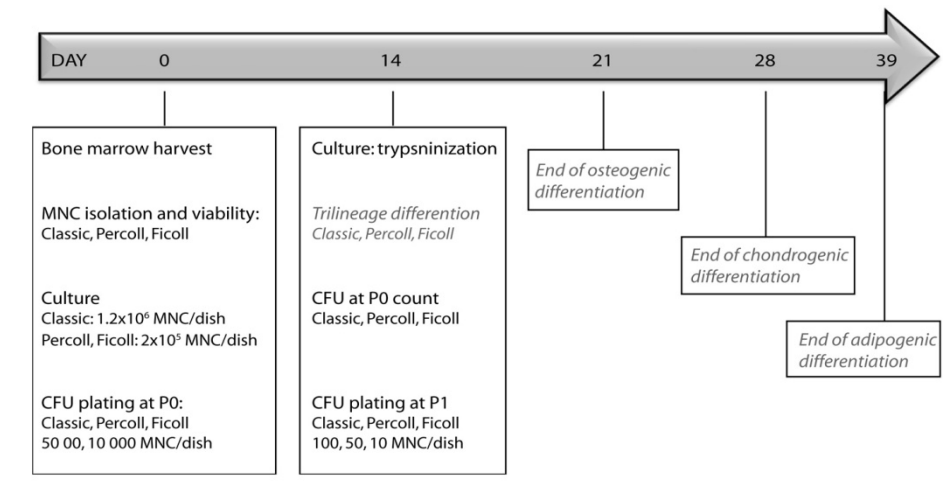
Figure 2:

Figure 3:

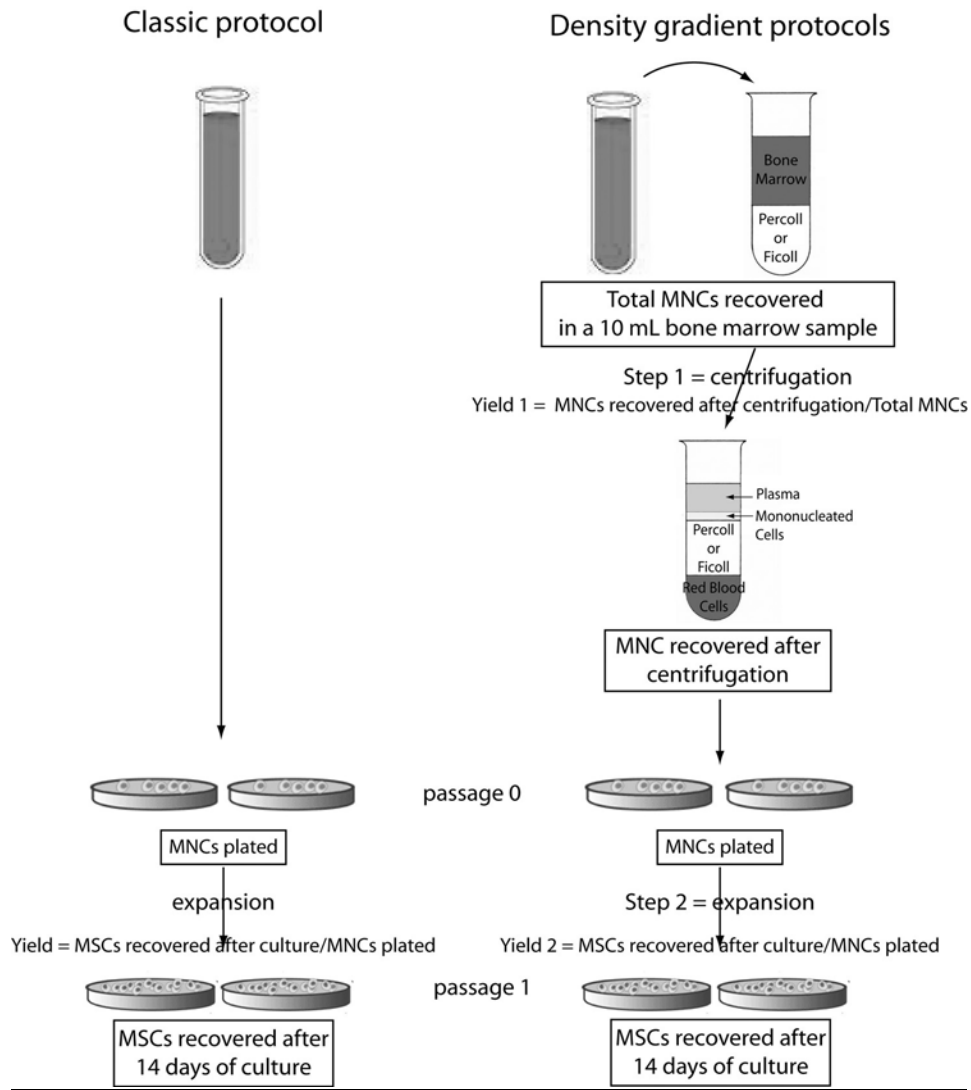
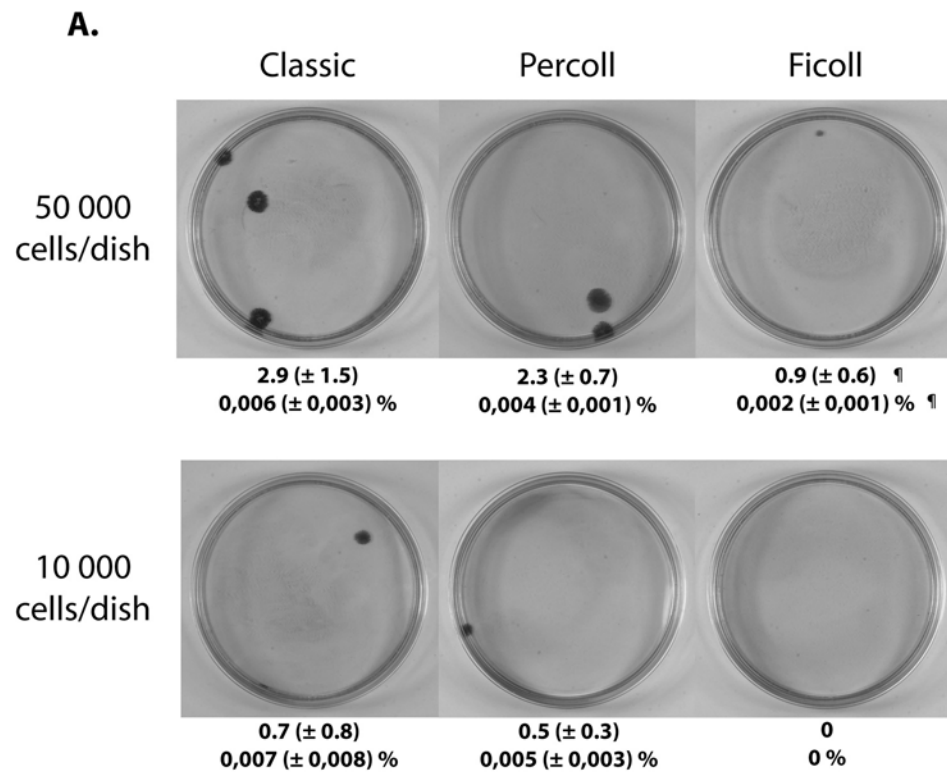


Figure 4:

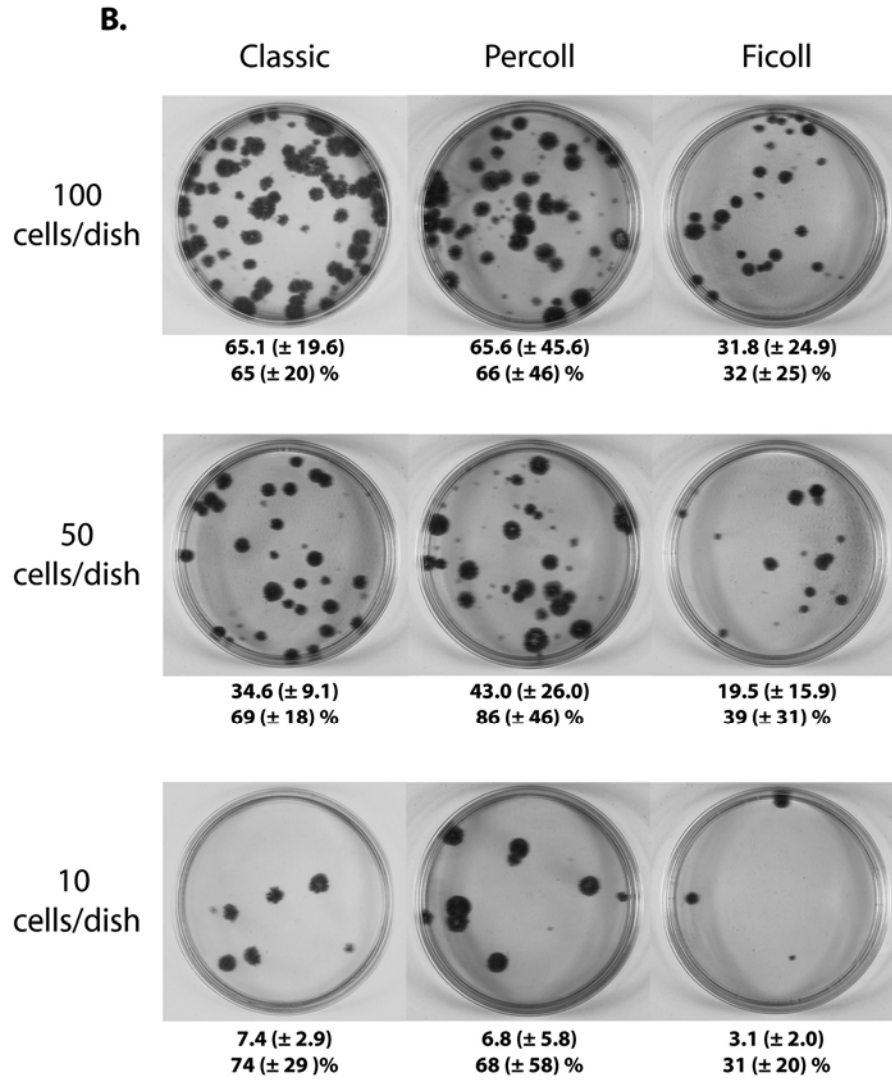
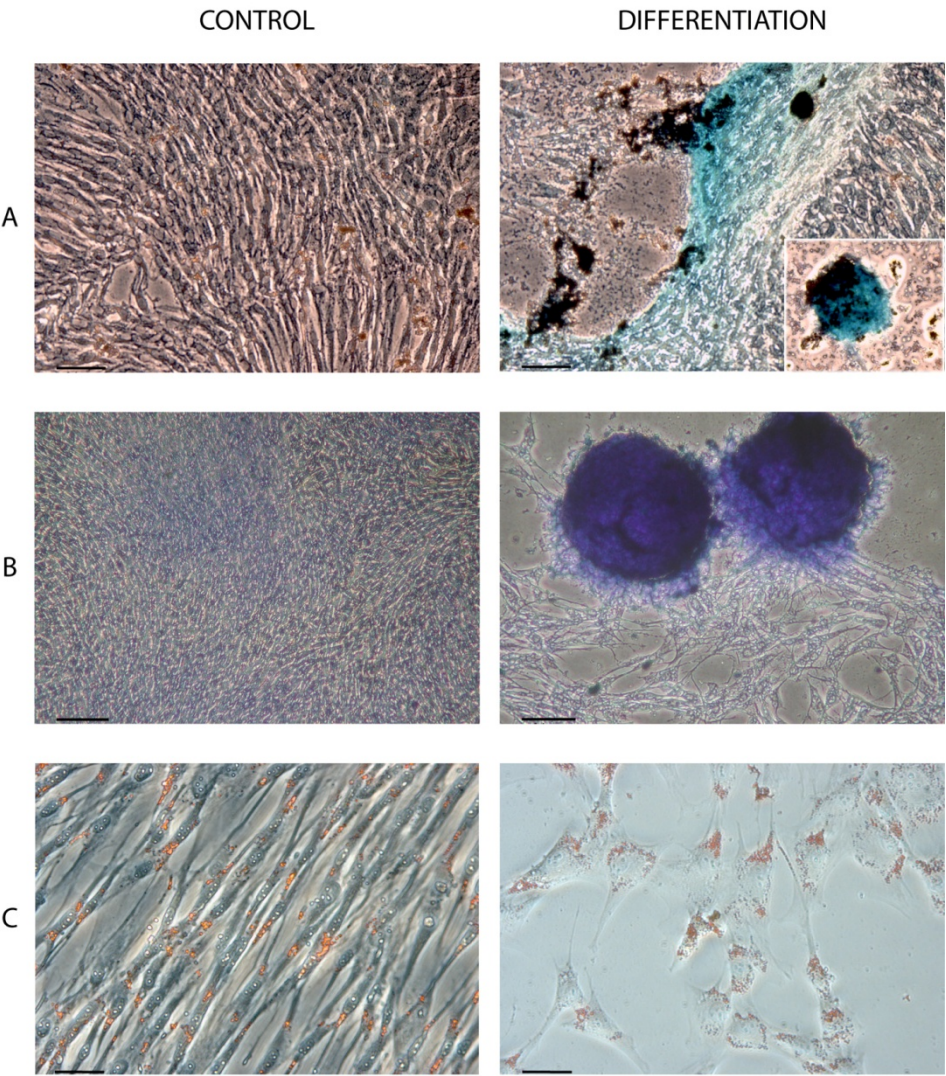
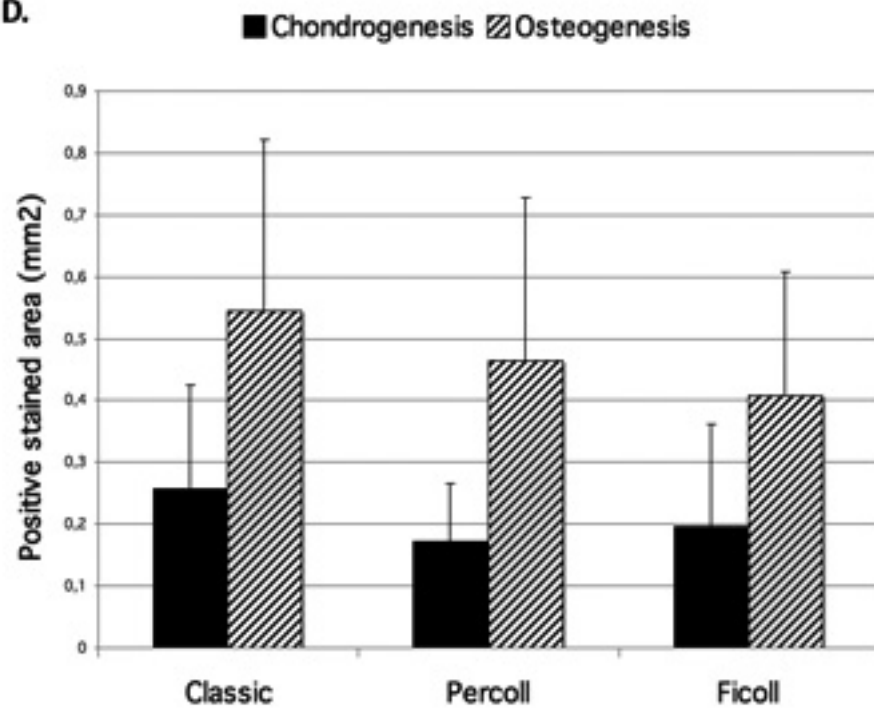


Figure 5:



D.



Chapitre 3 : Élaboration d'un modèle de guérison tendineuse (étude pilote)

3.1 Introduction

A ce jour, différents modèles d'étude de la guérison tendineuse existent chez le Cheval, que ce soit *in vitro* (cellules isolées, explants) ou *in vivo* (transsection tendineuse, injection de collagénases). Le principal inconvénient des études *in vitro* est l'absence des forces de tension qui participent à la réorganisation de la MEC et à l'orientation des fibres de collagène dans le tendon. Le principal inconvénient des études *in vivo* sont leur réalisation sur les tendons fléchisseurs, résultant en de l'inconfort et des boiteries qui peuvent persister au-delà d'une semaine (Williams *et al.* 1984). De plus, ces études se soldent généralement par l'euthanasie du cheval pour prélever le tissu de cicatrisation et l'étudier, voire pour raison humanitaire (modèle de transsection tendineuse) à cause de la forte douleur que peut engendrer le modèle (Bertone *et al.* 1990). L'objectif de cette étude est d'élaborer un modèle de guérison tendineuse *in vivo*, qui serait minimal invasif, afin d'évaluer les effets d'un traitement par les CSMs. Ce modèle serait une alternative aux modèles aux collagénases et de transsection des tendons fléchisseurs, plus invasifs, actuellement utilisés chez le Cheval.

3.2 Matériel et méthodes

Le protocole expérimental a été approuvé par le comité de déontologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

3.2.1 Animaux

Cinq juments Standardbred de 450 à 550 kg, cliniquement saines, âgées de 12 (\pm 4) ans ont été utilisées dans cette étude.

3.2.2 Procédure chirurgicale : induction d'un défaut tendineux

La procédure était réalisée sur cheval debout, sous sédation (acépromazine¹ 0,04 mg/kg IM, puis une demi-heure après détomidine² 0,03 mg/kg, IV et butorphanol³ 0,3 mg/kg IV), dans un travail. Les juments recevaient une antitoxine tétanique, une antibiothérapie (TMS⁴ 20 mg/kg, IV) et une analgésie (phénylbutazone⁵ 2,2 mg/kg PO) une demi-heure avant la procédure. Un bloc locorégional péronier superficiel et profond était réalisé, entre le muscle extenseur long du doigt et le muscle extenseur latéral du doigt, 10 cm dorsalement à la malléole latérale du tibia avec de la lidocaïne⁶. Le jarret gauche était tondu de mi-tibia à mi-canon sur toute la circonférence du membre et préparé chirurgicalement de façon standard.

Une incision cutanée de 4 cm de longueur, oblique, était pratiquée en regard du tendon extenseur latéral du doigt, 1 cm proximale à son attache sur le tendon extenseur long du doigt, en face latérale du métatarse. Le tendon était exposé par dissection mousse à l'aide d'un ciseau Metzemaum sur 2 cm environ, distalement à la gaine tendineuse. Le paratendon était ouvert avec un bistouri lame 10. Une ténectomie de 0,5 cm de long était réalisée à l'aide du bistouri lame 10, en laissant au moins 0,5 cm de tissu proximement à la zone de fusion entre le tendon extenseur latéral du doigt et le tendon extenseur long du doigt (figure 1). La longueur du défaut créé (rétraction des extrémités tendineuses) était ensuite mesurée avec une règle chirurgicale.



Figure 1 : Modèle de guérison tendineuse : ténectomie du tendon extenseur latéral du doigt

a) Le tendon extenseur latéral est isolé puis chargé sur une pince hémostatique ; b) Défaut tendineux (« gap healing », flèche ouverte) après ténectomie, extrémité tendineuse distale (flèche pleine)

La peau était ensuite fermée avec des agrafes. Un bandage protecteur était ensuite appliqué puis changé tous les 3 jours pendant 2 semaines, au terme desquelles les agrafes étaient retirées. Les juments étaient gardées au repos, au box pendant 7 semaines. La présence d'une boiterie (gradée de 0 à 5, (Anon 1991)), l'évolution de la plaie de chirurgie (inflammation, écoulements, douleur à la palpation), la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la température, l'appétit et le passage de fumier étaient notés tous les jours pendant 7 semaines.

3.2.3 Suivi échographique de la guérison tendineuse

Un examen échographique complet était réalisé juste avant la procédure chirurgicale (T_0) puis après 2 (T_2), 5 (T_5) et 7 (T_7) semaines avec une sonde linéaire⁷ à afin de suivre l'évolution de la guérison tendineuse. Lors de chaque examen, les dimensions (largeur, épaisseur, surface) et l'échogénicité (gradée de 1 à 5, 1- anéchogène, 2- hypoéchogène, 3- hétérogène, 4- piquetés hyperéchogènes, 5- normal) du tendon (T_0) ou du tissu cicatriciel (T_2 , T_5 et T_7) étaient évaluées en coupe transversale (Marr *et al.* 1993). La longueur de la lésion, l'arrangement linéaire des échos (gradé de 0 à 5, 0- absence d'écho, 1- échos peu nombreux et courts, 2- échos nombreux et courts, 3- échos peu nombreux, longs et irréguliers, 4- échos nombreux, longs et irréguliers, 5- échos normaux, longs et parallèles), ainsi que la délimitation de la lésion par rapport au tissu tendineux normal (gradée de 1 à 4, 1- visible avec différence d'échogénicité évidente, 2- visible avec différences d'échogénicité modérées, 3- difficile à voir et 4- invisible) étaient évalués sur la coupe longitudinale (Marr *et al.* 1993).

3.2.4 Prélèvement du tissu tendineux cicatriciel

Après 7 semaines, la procédure chirurgicale était renouvelée afin de prélever le tissu cicatriciel, en incluant des marges de 0,5 cm de tendon sain à chacune des 2 extrémités. Cette procédure a été réalisée sur 3 des 5 chevaux. Les caractéristiques macroscopiques du tissu cicatriciel (dimensions (largeur, épaisseur, longueur), consistance, couleur, adhérences (0- pas d'adhérence, 1- adhérences fines et facilement séparables, 2- adhérences épaisses, dans une zone limitée, 3- adhérences épaisses et diffuses (Saini *et al.* 1998)) étaient notées. Le tissu cicatriciel était ensuite coupé en 2 sections dans le sens longitudinal, une moitié destinée à l'examen histologique, la deuxième moitié, congelée, destinée aux tests

biomécaniques. Les changements de bandage et le suivi de l'état général étaient réalisés de la même façon que lors de la création du défaut tendineux, pendant 2 semaines.

3.2.5 Examen histologique

La section de tissu cicatriciel était divisée en deux parties dans le sens transversal lorsqu'elle dépassait 1cm puis fixée dans le HOPE®⁸, déshydratée à l'acétone, incluse dans la paraffine, coupée en section de 5 µm et montée sur lame. La densité des ténocytes, la présence d'hémorragie, la néovascularisation, l'infiltration de cellules inflammatoires étaient déterminées avec une coloration à HPS et gradées de 1 à 4 (1- normal, 2- légère augmentation, 3- augmentation modérée, 4- augmentation sévère, (Nixon *et al.* 2008)). L'organisation du collagène était déterminée avec une coloration au rouge de picrosirius associée à la lumière polarisée.

3.3 Résultats

3.3.1 Induction du défaut tendineux

La ténectomie a résulté en la création d'un défaut tendineux de 9 (\pm 4) mm de long. Suite à la chirurgie et pendant toute la durée du suivi, les juments n'ont pas présenté d'altération de l'état général. Le lendemain de la chirurgie, deux juments (3 et 4) ont présenté une boiterie de grade 1/5 qui s'est résolue dès le jour suivant. Chez toutes les juments, une légère inflammation des tissus sous cutanés est apparue en regard de la plaie et s'est résorbée en 3 jours. Deux jours après le retrait des agrafes, les 5 juments ont présenté un œdème du membre, de la chaleur et des écoulements séreux en regard de la plaie, associés à une nécrose cutanée superficielle. Ces complications ont été traitées avec de l'hydrothérapie froide et l'application d'un onguent à base de nitrofurazone⁹. Une induration et un épaissement cutanés ont persisté plus de 7 semaines après la chirurgie chez respectivement 3 et 2 des 5 juments.

3.3.2 Suivi échographique de la guérison tendineuse

Le suivi échographique de la guérison n'a pu être réalisé des semaines T₂ à T₅ en raison des complications survenues, la présence de croûtes empêchant le contact adéquat de la sonde avec la peau.

Chez les 5 chevaux, un tissu cicatriciel était visible entre les extrémités tendineuses. Les dimensions du tendon étaient diminuées à T₂ (n=3/5) ou augmentées (n=2/5)

comparativement à T_0 , puis elles continuaient d'augmenter jusqu'à T_7 . De même, les dimensions de la lésion augmentaient de T_2 jusqu'à T_7 . Ces dimensions restaient très variables d'un cheval à l'autre (tableau I). L'échogénicité du tissu cicatriciel était très diminuée (grade 1 ou 2) à T_2 puis augmentait progressivement (grade 3 ou 4) jusqu'à T_7 mais sans revenir à l'échogénicité d'un tissu tendineux normal (grade 5). En coupe longitudinale, l'arrangement linéaire des échos était variable à T_2 (grade 0 à 2), diminuait ($n=2/5$), augmentait ($n=1/5$) ou restait stable ($n=2/5$) à T_5 puis augmentait progressivement à T_7 (grade 2 ou 3) sans revenir aux caractéristiques d'un tendon normal.

La figure 2 représente un exemple de l'évolution de la cicatrisation tendineuse après la ténectomie.

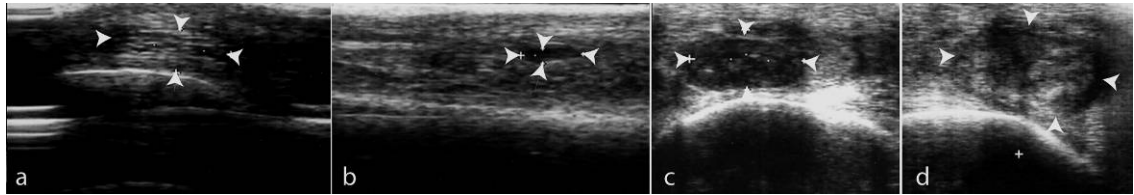


Figure 19 : Un exemple de suivi échographique (coupe transversale) de la guérison tendineuse après ténectomie

Les têtes de flèche délimitent la périphérie du tendon. a) Juste avant la ténectomie : tendon normal ; b) 2 semaines après la ténectomie (T_2) : le défaut tendineux est très peu comblé par du tissu cicatriciel ; c) 5 semaines après la ténectomie (T_5) : Le tendon est de taille augmentée aux extrémités tendineuses, le tissu cicatriciel est hypertrophié, l'échogénicité est hétérogène avec quelques points hyperéchogènes ; d) 7 semaines après la ténectomie, la taille des extrémités tendineuses a encore augmenté, l'échogénicité du tissu cicatriciel est très hétérogène.

La délimitation entre le tissu cicatriciel et le tissu tendineux normal, même si elle tendait à diminuer ($n=4/5$), restait toujours visible à T_7 , sauf dans 1 cas. Ainsi, au cours du processus de guérison, les paramètres évalués par échographie étaient très variables dans le temps et d'un cheval à l'autre (tableau I).

Cheval	Temps	Extrémités tendineuses			Lésion						
		Largeur (cm)	Épaisseur (cm)	Aire (cm ²)	Largeur (cm)	Épaisseur (cm)	Aire (cm ²)	Longueur (cm)	Échogénicité (grade)	Arrangement échos (grade)	Délimitation (grade)
1	T0	0,92	0,5	0,34	0	0	0	0	5		
	T2	0,89	0,28	0,21	0,69	0,2	0,08	0,63	2	4	4
	T5	1,31	0,51	0,56	1,54	0,82	0,9	2,1	4	2	2
	T7	1,33	0,7	0,72	2,14	1,3	1,74	2,85	4	3	3
2	T0	0,9	0,37	0,29	0	0	0	0	5		
	T2	1,13	0,43	0,38	1,09	0,29	0,19	0,7	1	4	4
	T5	1,37	0,67	0,64	1,5	0,95	1,14	1,58	3	2	2
	T7	1,6	0,42	0,62	2,21	1,39	2,64	> 3,5	3	2	2
3	T0	1,17	0,38	0,35	0	0	0	0	5		
	T2	1,08	0,34	0,31	0,69	0,21	0,11	1,29	2	3	3
	T5	1,28	0,83	0,83	1,97	1,29	2	2,12	4	3	3
	T7	1,52	1,05	1,45	28,3	1,52	3,56	3,4	4	3	3
4	T0	1,25	0,44	0,45	0	0	0	0	5		
	T2	1,16	0,37	0,38	0,59	0,28	0,12	0,8	2	4	4
	T5	1,5	0,90	1,17	Non mesurable			> 3,5	4	1	1
	T7	1,57	0,99	1,33	2,29	1,31	2,68	3,19	3	2	2
5	T0	0,8	0,3	0,19	0	0	0	0	4		
	T2	1,31	0,89	0,89	1,57	0,83	1,12	1,9	2	2	2
	T5	1,41	0,73	0,73	1,75	1,2	1,58	2,61	4	3	3
	T7	1,33	0,9	0,97	Non mesurable			> 3,5	3	4	4

Tableau I : Résumé des résultats de l'examen échographique

3.3.3 Prélèvement du tissu cicatriciel

La procédure chirurgicale permettant de prélever le tissu tendineux cicatriciel était plus longue (60 à 80 minutes, mais non mesuré précisément) et plus difficile que la procédure permettant d'induire le défaut tendineux. En effet, de nombreuses adhérences (grade 3 pour les 3 chevaux) au tissu sous cutané étaient présentes et les nombreux saignements (environ 3 fois plus importants que la première chirurgie), liés à une néovascularisation importante, limitaient la bonne visibilité du site chirurgical. Le tissu récolté était un tissu amorphe hypertrophié, de taille très variable (figure 3) d'un cheval à l'autre, rouge en surface et jaune-brun en coupe, de consistance gélatineuse.

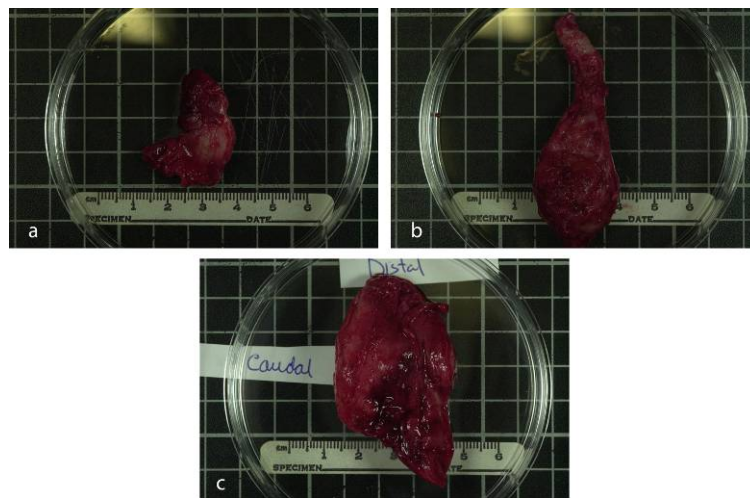


Figure 3 : Tissu cicatriciel prélevé 7 semaines après la ténectomie chez les juments 1 (a), 2 (b) et 3 (c)

Chez un cheval, il englobait une partie de l'extenseur long du doigt. Chez deux chevaux, les dimensions (largeur et épaisseur) du tendon extenseur long du doigt étaient augmentées comparativement à ce qu'elles étaient lors de la création du défaut tendineux. Le prélèvement n'a pas été réalisé sur 2 des 5 chevaux en raison de la grande variabilité observée sur les 3 premiers.

3.3.4 Examen histologique

En raison de la grande variabilité observée macroscopiquement lors du prélèvement du tissu cicatriciel, l'examen histologique n'a pas été réalisé.

La figure 4 représente un exemple de tissu cicatriciel obtenu.

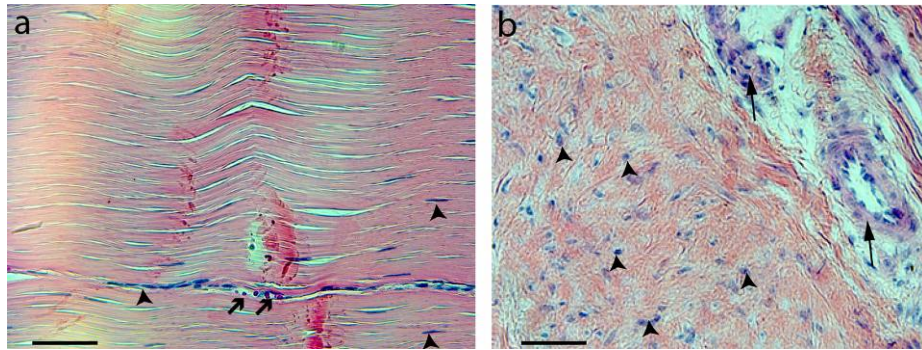


Figure 4 : Section longitudinale de tendon normal (a, contrôle) et du tissu cicatriciel obtenu 7 semaines après la ténectomie (b)

Coloration : Hématoxyline, Phloxine, Safran, barre = 50 μ m

Dans le tissu cicatriciel, la cellularité est très augmentée et les ténocytes (têtes de flèches ne sont pas organisés en rangée. L'alignement des fibres de collagène est aléatoire et le tissu ne présente pas d'ondulation. Les flèches ouvertes indiquent les globules rouges et les flèches pleines les vaisseaux sanguins.

3.4 Conclusion

En raison de la grande variabilité de guérison observée entre les animaux, du nombre restreint d'animaux dont nous disposions et de la contrainte de temps, nous avons jugé ce modèle inadéquat pour évaluer l'efficacité d'une thérapie par les CSMs. De futures études seraient toutefois nécessaires afin d'établir un modèle de guérison tendineuse qui soit minimal invasif.

3.5 Produits utilisés

¹ Atravet : Wyeth Animal Health, Division of Wyeth Canada, Guelph, Ontario, Canada

² Dormosedan : Pfizer Animal Health, Kirkland, Quebec, Canada

³ Torbugesic : Wyeth Animal Health, Division of Wyeth Canada, Guelph, Ontario, Canada

⁴ Novotrimel : Novopharm Animal Health, Scarborough, Ontario, Canada

⁵ Phenylbutazone : Professional Veterinary Laboratories, Winnipeg, Manitoba, Canada

⁶ Lurocaïne : Vetoquinol Canada Inc., Lavaltrie, Quebec, Canada

⁷ Sonde linéaire 7,5 MHz : Universal Medical Systems Inc., Bedford Hills, NY, USA

⁸ HOPE : Corporate Headquarters. Warrington, PA, USA

⁹ Furacin : Vetoquinol Canada Inc., Lavaltrie, Quebec, Canada

Chapitre 4 : Discussion générale

Les deux objectifs de ce projet étaient de comparer 3 protocoles d'isolement des CSMs couramment employés afin de déterminer lequel était le plus adapté dans le cadre de la thérapie cellulaire chez le cheval puis de développer un modèle de guérison tendineuse minimal invasif afin d'étudier les effets des cellules isolées avec le protocole déterminé précédemment sur cette guérison.

4.1 Comparaison de protocoles d'isolement des cellules souches mésenchymateuses chez le cheval

Dans cette étude, nous avons montré que le nombre de CSMs obtenues à partir d'un prélèvement de moelle osseuse après 14 jours de culture était affecté de façon significative par le protocole d'isolement utilisé, de même que le nombre de unités de formations de colonies (CFUs), un paramètre permettant d'évaluer la capacité de renouvellement des cellules. Au contraire, il semblerait que les capacités de différenciation des CSMs ne soient pas affectées par le protocole employé.

De façon plus spécifique, le nombre de CSMs récoltées 14 jours post-culture, ainsi que le nombre de CFUs aux passages 0 et 1 étaient protocole-dépendants. Bien que le nombre de CSMs récoltées soit plus élevé avec les protocoles utilisant un gradient de densité comparés au protocole classique (adhérence des cellules), seul le Percoll permettait d'obtenir un nombre de CSMs significativement augmenté. Ces résultats peuvent s'expliquer par les différences de densités d'ensemencement entre les protocoles (densité plus élevée dans le protocole classique, ce qui a pu modifier le comportement des cellules en culture) et par la présence de « contaminants » dans ce dernier (globules rouges, granulocytes, plaquettes et précurseurs de la lignée myéloïde (Fortier 2005; Lennon and Caplan 2006; Pountos *et al.* 2007)), qui pourraient limiter la multiplication des CSMs.

Concernant les CFUs, leur nombre était significativement moins élevé au passage 0 après isolement au Ficoll, comparativement au protocole classique. Ce résultat était confirmé par une capacité d'expansion des CSMs inférieure lorsque les cellules étaient isolées par le Ficoll, comparativement au Percoll, toujours au passage 0. Une étude portant sur la comparaison du Percoll et du Ficoll dans l'isolement de CSMs de moelle osseuse chez l'Homme rapporte, de façon similaire, un nombre de CFUs inférieur après isolement

par le Ficoll (Georgiou *et al.* 1983), ce qui corrobore nos résultats. Cependant dans cette dernière étude, le gradient de Percoll utilisé était un gradient discontinu et de densité inférieure à celle utilisée dans notre étude. Des résultats similaires ont été obtenus après isolements des CSMs par le Percoll et le Ficoll associé au sodium de métrizoate (Vannier *et al.* 1980). Comme les solutions de Percoll et de Ficoll diffèrent par leurs compositions, notre hypothèse est que le Percoll peut diminuer ou retarder les capacités de multiplication des CSMs. Cependant, des investigations complémentaires sont nécessaires pour la confirmer.

4.2 Élaboration d'un modèle de guérison tendineuse chez le cheval

Dans cette étude pilote, nous avons tenté de développer un modèle de guérison tendineuse peu invasif afin de l'utiliser pour l'étude de traitements permettant l'amélioration de la guérison tendineuse chez le Cheval. La ténectomie du tendon extenseur latéral réalisée pour élaborer ce modèle est simple et relativement rapide. Cette chirurgie est d'ailleurs réalisée couramment pour traiter le harper (Sullins 2002) ou lors de la collecte de greffon tendineux (Reiners *et al.* 2002). D'autres modèles de guérison tendineuse comme la tendinite induite aux collagénases bactériennes (Nixon *et al.* 2008) ou plus récemment la ténectomie partielle (Guest *et al.* 2008) ont été utilisés pour étudier les effets de l'implantation de CSMs sur la guérison du TFSD. Cependant ces études se soldaient toutes par l'euthanasie des chevaux pour la récolte du tissu de guérison. Le modèle développé dans notre étude n'aboutissait pas à l'euthanasie des chevaux et ne résultait qu'en des signes d'inconfort temporaires et modérés.

Les complications rencontrées, à savoir l'œdème du membre et la nécrose cutanée superficielle 2 semaines après la ténectomie, sont vraisemblablement liées à un bandage trop serré ayant compromis la circulation sanguine. D'ailleurs, cette complication n'a pas été observée suite à l'excision du tissu tendineux cicatriciel. Cependant, il est possible qu'en limitant l'apport sanguin au tendon, cette compression ait ralenti voire compromis la cicatrisation. En effet, au terme de 7 semaines, nous avons obtenu un tissu cicatriciel amorphe, gélatineux avec un arrangement aléatoire des fibres de collagène correspondant à un tissu en phase de prolifération alors que la phase de remodelage, caractérisée par l'alignement des fibres de collagène et la synthèse de protéoglycanes, aurait du débiter

(Watkins *et al.* 1985). Cependant, en raison de la grande variabilité macroscopique du tissu cicatriciel, les analyses histologiques et biochimiques n'ont pas été réalisées, empêchant de tirer de solides conclusions. Il était en effet prévu d'analyser l'arrangement des fibres de collagène avec la coloration au rouge de picrosirius sous lumière polarisée, le type de fibres de collagène (I ou III) par immunohistochimie et le contenu en protéoglycanes.

La réalisation de ce modèle nous a permis de mettre en évidence l'abondance de la néovascularisation au cours de la guérison tendineuse. Des adhérences nombreuses et épaisses étaient également visibles (grade 3). De telles adhérences ont également été mise en évidence dans un modèle de ténectomie du TFSD, avec un défaut tendineux de 3 cm (Saini *et al.* 1998). Nous avons également observé une hypertrophie du tendon extenseur long du doigt, adjacent au tendon extenseur latéral du doigt. Notre hypothèse est que le tendon extenseur long a bénéficié des effets des facteurs de croissance libérés lors du processus de guérison tendineuse.

4.3 Limites et directions futures

Notre modèle de guérison consistait en une ténectomie et était de ce fait plus représentatif de la guérison que l'on observe lors de lacérations que lors de tendinites. De plus, le défaut tendineux était créé dans un tendon extenseur et non un fléchisseur. Cependant, chez l'Homme, *in vitro*, il n'a été montré de différence de comportement entre les cellules tendineuses issues d'un tendon fléchisseur et celles issues d'un tendon extenseur lorsque ces tendons étaient soumis à des conditions biomécaniques identiques (Evans and Trail 2001). Il pourrait toutefois être intéressant de comparer la guérison d'un tendon extenseur et d'un tendon fléchisseur chez le Cheval, afin de savoir si les résultats obtenus pour un tendon extenseur peuvent être extrapolés à un tendon fléchisseur.

Le défaut tendineux était limité uniquement crânialement et distalement par les extrémités tendineuses. Contrairement au modèle aux collagénases bactériennes, la lésion créée ne procurait pas un environnement clos permettant l'implantation et la prolifération de CSMs de façon optimale. Ainsi, le modèle de ténectomie partielle du tendon fléchisseur superficiel du doigt proposé par Guest (Guest *et al.* 2008) serait peut être une approche plus adaptée que la ténectomie complète puisque le défaut tendineux est limité à la fois dans les sens proximo-distal et latéro-médial. Cependant, il aboutit, comme le modèle aux collagénases à l'euthanasie des chevaux sans toutefois procurer un milieu optimal d'implantation des CSMs.

Nous voulions utiliser notre modèle de guérison tendineuse afin d'analyser les effets des CSMs sur cette guérison chez le Cheval. Dans cette optique de médecine régénérative, il semble important, d'un point de vue fonctionnel, que ces cellules ne perdent pas leur capacité de différenciation. Dans notre étude sur la comparaison de 3 protocoles d'isolement des CSMs, les capacités de différenciation des CSMs en ostéocytes et en chondrocytes n'étaient pas affectées par le protocole employé. Cependant, nous n'avons essayé de les différencier en ténocytes comme décrit récemment chez le Cheval (Violini *et al.* 2009). Bien qu'il soit de plus en plus admis que le rôle principal des CSMs dans le processus de guérison soit la sécrétion de facteurs trophiques (cytokines et facteurs de croissance (Caplan and Dennis 2006)) et que leur capacité à se différencier ne soit pas une caractéristique essentielle dans l'amélioration de la guérison, il aurait pu être intéressant de vérifier si cette capacité de différenciation en ténocytes était similaire dans les 3 protocoles d'isolement. Par ailleurs, chez la Souris, il a été montré *in vitro* que la différenciation des CSMs en ostéocytes était inhibée par les cytokines pro-inflammatoires (Lacey *et al.* 2008). Puisqu'en clinique, les CSMs peuvent être implantées dans un contexte inflammatoire (bien qu'il soit conseillé d'attendre la fin de la phase inflammatoire initiale (Richardson *et al.* 2007)), il y a un intérêt à étudier le comportement de différenciation et le profil sécrétoire des CSMs isolées par les différents protocoles, dans un milieu inflammatoire.

De façon plus précise, des études d'expression génique (Menicanin *et al.* 2009) et de profils métabolomiques (Mareddy *et al.* 2009) pourraient s'avérer essentielles afin de s'assurer que leur fonction, au niveau moléculaire, ne soit pas altérée par le protocole d'isolement. La migration des CSMs en réponse aux cytokines est également une étape importante du processus de guérison. Il a été récemment rapporté chez l'homme que la capacité de migration *in vitro* des CSMs pouvait être diminuée selon le protocole d'isolement (Seeger *et al.* 2007). Il serait donc également important d'étudier cette capacité de migration *in vivo*, et ce en fonction du protocole d'isolement utilisé. Un moyen de le faire est la transfection des CSMs avec un gène de fluorescence, comme il a été rapporté récemment (Guest *et al.* 2008).

Dans notre étude, nous n'avons pas caractérisé les CSMs par leurs marqueurs membranaires. Il a cependant été montré que les CSMs équines exprimaient le CD90 (moelle osseuse (Arnhold *et al.* 2007)), le CD 90, le CD 105 et le CD 54 (cordon ombilical (Hoynowski *et al.* 2007)) ou le CD 90, le CD 29 et Stro-1 (tissu adipeux (Pascucci *et al.*

2007)). Dans cette dernière étude, le CD 73 et le CD 146 (autres marqueurs positifs) ont été testés mais étaient négatifs. Parce que les anticorps utilisés n'étaient pas spécifiques du Cheval, les résultats obtenus pourraient être faussement négatifs. Dans cette même étude, les marqueurs CD 133, CD 34, CD 45 et CD 105 étaient également testés et étaient négatifs. Pourtant, tant que les anticorps utilisés ne sont pas validés chez le Cheval, ces résultats ne peuvent être considérés comme de vrais négatifs. Il est donc d'une grande importance de développer un ensemble de marqueurs qui soient spécifiques du Cheval, afin de correctement caractériser les cellules isolées et permettre des comparaisons pertinentes entre les différentes études. Une alternative à l'utilisation des anticorps serait la mise en évidence des gènes correspondant à ces marqueurs, par PCR par exemple comme récemment décrit chez le Cheval (Violini *et al.* 2009). Une caractérisation précise des CSMs constitue cependant un véritable défi puisque le concept même de CSs est en perpétuelle évolution.

Conclusion

Notre étude portant sur 3 protocoles d'isolement des CSMs chez le Cheval a permis d'établir que, pour une quantité de moelle osseuse donnée, le Percoll autorisait l'obtention d'un plus grand nombre de CSMs, avec des capacités de renouvellement supérieures comparativement au Ficoll. Par ailleurs, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence dans les capacités de différenciation de ces cellules. Ainsi, le Percoll devrait être considéré à l'avenir comme le protocole de choix pour l'isolement des cellules CSMs chez le Cheval. Pourtant, bien que ces cellules soient couramment employées en clinique chez les chevaux athlètes avec des résultats prometteurs dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la guérison de certaines affections du système myoarthrosquelettique, les recherches doivent continuer afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces cellules et leurs effets, *in vitro* mais aussi *in vivo*, afin de déterminer de façon plus précise le protocole d'isolement idéal et d'utiliser ces cellules de manière adéquate. Il reste encore de grandes lacunes dans ce domaine, puisqu'il n'existe pas de définition rigoureuse des CSs, ni de moyen de les caractériser parfaitement. Ces connaissances sont pourtant essentielles afin d'optimiser la thérapie cellulaire.

Dans le cadre de leur utilisation en médecine régénérative, nous avons essayé de développer un modèle permettant d'étudier et de mieux comprendre les effets des CSMs sur la guérison tendineuse. Bien que minimal invasif, ce modèle n'était pas adapté à cet objectif et il semble que le modèle aux collagénases soit à ce jour le plus approprié pour cette étude.

Bibliographie

- Aggarwal, S. and Pittenger, M.F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822.
- Alexander, G.R., Gibson, K.T., Day, R.E. and Robertson, I.D. (2001) Effects of superior check desmotomy on flexor tendon and suspensory ligament strain in equine cadaver limbs. *Vet Surg* **30**, 522-527.
- Allen, A.K. (1992) Experience with ultrasound-guided tendon puncture or splitting. In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. pp 273-277.
- Anon (1991) Lameness scale. Definition and classification of lameness. In: *Guide for Veterinary Service and Judging of Equestrian Events*, American Association of Equine Practitioners, Lexington (KY) pp. 19.
- Arnhold, S.J., Goletz, I., Klein, H., Stumpf, G., Beluche, L.A., Rohde, C., Addicks, K. and Litzke, L.F. (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* **68**, 1095-1105.
- Awad, H.A., Butler, D.L., Boivin, G.P., Smith, F.N., Malaviya, P., Huibregtse, B. and Caplan, A.I. (1999) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering* **5**, 267-277.
- Barry, F.P. (2003) Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 250-256.
- Baumgarth, N. and Roederer, M. (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* **243**, 77-97.
- Benjamin, M. and Ralphs, J.R. (1997) Tendons and ligaments-an overview. *Histology and histopathology* **12**, 1135-1144.
- Bensidhoum, M., Chapel, A., Francois, S., Demarquay, C., Mazurier, C., Fouillard, L., Bouchet, S., Bertho, J.M., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Charbord, P., Gorin, N.C., Thierry, D. and Lopez, M. (2004) Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* **103**, 3313-3319.
- Bertone, A.L., Stashak, T.S., Smith, F.W. and Norrdin, R.W. (1990) A comparison of repair methods for gap healing in equine flexor tendon. *Vet Surg* **19**, 254-265.
- Bi, Y., Ehrichtiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.M., Zhang, L., Shi, S. and Young, M.F. (2007) Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*.

- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. and Robey, P.G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **19**, 180-192.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. and Weimann, J.M. (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829-841.
- Boyum, A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 9-29.
- Burks, R.T., Haut, R.C. and Lancaster, R.L. (1990) Biomechanical and histological observations of the dog patellar tendon after removal of its central one-third. *The American journal of sports medicine* **18**, 146-153.
- Burt, R.K., Loh, Y., Pearce, W., Beohar, N., Barr, W.G., Craig, R., Wen, Y., Rapp, J.A. and Kessler, J. (2008) Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA* **299**, 925-936.
- Cai, J., Weiss, M.L. and Rao, M.S. (2004) In search of "stemness". *Exp Hematol* **32**, 585-598.
- Cao, Y., Liu, Y., Liu, W., Shan, Q., Buonocore, S.D. and Cui, L. (2002) Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plastic and reconstructive surgery* **110**, 1280-1289.
- Caplan, A.I. (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* **213**, 341-347.
- Caplan, A.I. and Dennis, J.E. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* **98**, 1076-1084.
- Carpenter, J.E. and Hankenson, K.D. (2004) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials* **25**, 1715-1722.
- Carpenter, J.E., Thomopoulos, S. and Soslowsky, L.J. (1999) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Clinical orthopaedics and related research*, S296-311.
- Chong, A.K., Ang, A.D., Goh, J.C., Hui, J.H., Lim, A.Y., Lee, E.H. and Lim, B.H. (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am* **89**, 74-81.
- Clegg, P.D. (2008) Biological therapies for treatment of tendon and ligament injuries. In: *British Equine Veterinary Association Congress 2008*, Liverpool.
- Clegg, P.D., Strassburg, S. and Smith, R.K. (2007) Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *International journal of experimental pathology* **88**, 227-235.

- Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. and Prockop, D.J. (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3213-3218.
- Colter, D.C., Sekiya, I. and Prockop, D.J. (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7841-7845.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V. and Uccelli, A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367-372.
- Crisostomo, P.R., Markel, T.A., Wang, Y. and Meldrum, D.R. (2008) Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery* **143**, 577-581.
- Dahlgren, L.A., Brower-Toland, B.D. and Nixon, A.J. (2005) Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses. *American journal of veterinary research* **66**, 266-270.
- Dahlgren, L.A., Nixon, A.J. and Brower-Toland, B.D. (2001) Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. *American journal of veterinary research* **62**, 1557-1562.
- de Campos Vidal, B. (2003) Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* **34**, 423-432.
- Delorme, B., Chateauvieux, S. and Charbord, P. (2006) The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med* **1**, 497-509.
- Dennis, J.E. and Caplan, A.I. (2004) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem Cells Handbook*, Ed: S. Sell, Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 107-117.
- Djouad, F., Charbonnier, L.M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C. and Noel, D. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 2025-2032.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317.
- Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R. and Smith, R.K. (2000) Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine veterinary journal* **32**, 369-378.
- Durando, M.M., Zarucco, L., Schaer, T.P., Ross, M. and Reef, V.B. (2006) Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration.

- Dyson, S.J. (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine veterinary journal* **36**, 415-419.
- Erices, A., Conget, P. and Minguell, J.J. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235-242.
- Evans, C.E. and Trail, I.A. (2001) An in vitro comparison of human flexor and extensor tendon cells. *J Hand Surg Br* **26**, 307-313.
- Fortier, L.A. (2005) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* **34**, 415-423.
- Fortier, L.A., Nixon, A.J., Williams, J. and Cable, C.S. (1998) Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* **59**, 1182-1187.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A. and Ruadkow, I.A. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**, 83-92.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. and Kulagina, N.N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**, 267-274.
- Genovese, R.L. and al., e. (1996) Superficial digital flexor tendonitis long term sonographic and clinical study of racehorses. In: *Proceedings of the first Dubai International Equine Symposium*, Dubai, United Arab Emirates.
- Georgiou, G.M., Robertson, D.M., Ellis, W.M., Shen, B.J., Ekert, H. and Hosking, C.S. (1983) CFU-c enrichment from human bone marrow using a discontinuous Percoll gradient and soybean agglutinin in comparison with Ficoll-paque. *Clin Exp Immunol* **53**, 491-496.
- Goodship, A.E., Birch, H.L. and Wilson, A.M. (1994) The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary clinics of North America* **10**, 323-349.
- Gruber, H.E. and Stasky, A.A. (1999) Histological study in orthopaedic animal research. In: *Animal models in orthopaedic research*, Eds: Y.H. An and R.J. Friedman, CRC Press, Boca Raton. pp 115-131.
- Guest, D.J., Smith, M.R. and Allen, W.R. (2008) Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine veterinary journal* **40**, 178-181.
- Guillot, P.V., Cui, W., Fisk, N.M. and Polak, D.J. (2007) Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* **11**, 935-944.

- Hayem, G. (2001) Tenology: a new frontier. *Joint Bone Spine* **68**, 19-25.
- Henninger, R. (1994) Treatment of superficial digital flexor tendinitis. *The Veterinary clinics of North America* **10**, 409-424.
- Herthel, D.J. (2001) Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. pp 319-321.
- Hildebrand, K.A., Jia, F. and Woo, S.L. (2002) Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon. *Microscopy research and technique* **58**, 34-38.
- Hogan, P.M. and Bramlage, L.R. (1995) Transection of the accessory ligament of the superficial digital flexor tendon for treatment of tendinitis: long term results in 61 standardbred racehorses (1985-1992). *Equine veterinary journal* **27**, 221-226.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. and Keating, A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393-395.
- Hoynowski, S.M., Fry, M.M., Gardner, B.M., Leming, M.T., Tucker, J.R., Black, L., Sand, T. and Mitchell, K.E. (2007) Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and biophysical research communications* **362**, 347-353.
- In 't Anker, P.S., Noort, W.A., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A.B., van Bezooijen, R.L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H.H. and Fibbe, W.E. (2003) Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**, 845-852.
- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G.M., Claas, F.H., Fibbe, W.E. and Kanhai, H.H. (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **22**, 1338-1345.
- Inokuchi, H., Suzuki, Y., Kasagi, N. and al., e. (2005) Micro Magnetic Separator for Stem Cell Sorting System. In: *Proceedings of the 22nd sensor symposium*, Tokyo. pp 125-128.
- Jann, H. and Pasquini, C. (2005) Wounds of the distal limb complicated by involvement of deep structures. *The Veterinary clinics of North America* **21**, 145-165, viii.
- Jann, H.W., Good, J.K., Morgan, S.J. and Berry, A. (1992) Healing of transected equine superficial digital flexor tendons with and without tenorrhaphy. *Vet Surg* **21**, 40-46.

- Jiang, W., Ma, A., Wang, T., Han, K., Liu, Y., Zhang, Y., Dong, A., Du, Y., Huang, X., Wang, J., Lei, X. and Zheng, X. (2006) Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflugers Arch* **453**, 43-52.
- Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D. and Mao, N. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120-4126.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49.
- Juncosa-Melvin, N., Boivin, G.P., Gooch, C., Galloway, M.T., West, J.R., Dunn, M.G. and Butler, D.L. (2006) The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue engineering* **12**, 369-379.
- Kannus, P. (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **10**, 312-320.
- Kasashima, Y., Takahashi, T., Smith, R.K., Goodship, A.E., Kuwano, A., Ueno, T. and Hirano, S. (2004) Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine veterinary journal* **36**, 346-350.
- Kersh, K.D., McClure, S.R., Van Sickle, D. and Evans, R.B. (2006) The evaluation of extracorporeal shock wave therapy on collagenase induced superficial digital flexor tendonitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* **19**, 99-105.
- Kirkendall, D.T. and Garrett, W.E. (1997) Function and biomechanics of tendons. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **7**, 62-66.
- Kisiday, J.D., Kopesky, P.W., Evans, C.H., Grodzinsky, A.J., McIlwraith, C.W. and Frisbie, D.D. (2008) Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* **26**, 322-331.
- Koch, T.G., Berg, L.C. and Betts, D.H. (2008) Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* **49**, 1009-1017.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D. and Betts, D.H. (2007) Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC biotechnology* **7**, 26.
- Koerner, J., Nesic, D., Romero, J.D., Brehm, W., Mainil-Varlet, P. and Grogan, S.P. (2006) Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 1613-1619.

- Kolf, C.M., Cho, E. and Tuan, R.S. (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy* **9**, 204.
- Krampera, M., Pasini, A., Pizzolo, G., Cosmi, L., Romagnani, S. and Annunziato, F. (2006) Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Current opinion in pharmacology* **6**, 435-441.
- Kryger, G.S., Chong, A.K., Costa, M., Pham, H., Bates, S.J. and Chang, J. (2007) A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *The Journal of hand surgery* **32**, 597-605.
- Lacey, D.C., Simmons, P.J., Graves, S.E. and Hamilton, J.A. (2008) Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*.
- Lavagnino, M., Arnoczky, S.P., Tian, T. and Vaupel, Z. (2003) Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP-1 mRNA expression in tendon cells: an in vitro study. *Connect Tissue Res* **44**, 181-187.
- Lee, E.H. and Hui, J.H. (2006) The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* **88**, 841-851.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C. and Jung, J.S. (2004) Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* **14**, 311-324.
- Lennon, D.P. and Caplan, A.I. (2006) Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **34**, 1604-1605.
- Loeffler, M. and Roeder, I. (2002) Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models-a conceptual approach. *Cells Tissues Organs* **171**, 8-26.
- Magra, M. and Maffulli, N. (2007) Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport*.
- Majors, A.K., Boehm, C.A., Nitto, H., Midura, R.J. and Muschler, G.F. (1997) Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* **15**, 546-557.
- Mareddy, S., Broadbent, J., Crawford, R. and Xiao, Y. (2009) Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **106**, 776-786.
- Marr, C.M., McMillan, I., Boyd, J.S., Wright, N.G. and Murray, M. (1993) Ultrasonographic and histopathological findings in equine superficial digital flexor tendon injury. *Equine veterinary journal* **25**, 23-29.

- McIlwraith, C.W. (2002) Disease of Joints, Tendons, Ligaments, and Related Structures. In: *Adams' lameness in horses*, 5th edn., Ed: T.S. Stashak, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore. pp 459-644.
- Menicanin, D., Bartold, P.M., Zannettino, A.C. and Gronthos, S. (2009) Genomic Profiling of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev.*
- Mitsiadis, T.A., Barrandon, O., Rochat, A., Barrandon, Y. and De Bari, C. (2007) Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* **313**, 3377-3385.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., Chen, W., Ried, T. and Shi, S. (2006) Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 1095-1103.
- Moore, K.A. and Lemischka, I.R. (2006) Stem cells and their niches. *Science (New York, N.Y)* **311**, 1880-1885.
- Muschler, G.F. and Midura, R.J. (2002) Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clinical orthopaedics and related research*, 66-80.
- Nauta, A.J. and Fibbe, W.E. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499-3506.
- Neagu, M., Suci, E., Ordodi, V. and Paunescu, V. (2005) Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. *Romanian J. Biophys.* **15**, 29-34.
- Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E. and Ward, D.L. (2008) Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American journal of veterinary research* **69**, 928-937.
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F. and Petrini, M. (2007) Suspension of Bone Marrow-Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses. *Tissue engineering*.
- Pascucci, L., Marini, C., Mercati, F., Dall'Aglio, C., Farneti, S. and Ceccarelli, P. (2007) Adipose-derived mesenchymal stem cells in the horse: isolation, in vitro expansion and preliminary identification in view of a possible use in the cellular therapy of tendon and ligament injuries. *Ippologia* **18**, 13-18.
- Passeri, S., Nocchi, F., Lamanna, R., Lapi, S., Miragliotta, V., Giannessi, E., Abramo, F., Stornelli, M.R., Matarazzo, M., Plenteda, D., Urciuoli, P., Scatena, F. and Coli, A. (2009) Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int* **33**, 100-105.

- Pasternak, B., Missios, A., Askendal, A., Tengvall, P. and Aspenberg, P. (2007) Doxycycline-coated sutures improve the suture-holding capacity of the rat Achilles tendon. *Acta Orthop* **78**, 680-686.
- Patel, S.A., Sherman, L., Munoz, J. and Rameshwar, P. (2008) Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**, 1-8.
- Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K. and Zhou, C. (2008) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* **17**, 761-773.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y)* **284**, 143-147.
- Pool, R.R. (1996) Pathologic changes in tendonitis of athletic horses. In: *Proceedings of the Dubai Equine International Symposium*, Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser. pp 109-117.
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P. and Giannoudis, P.V. (2007) Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* **38 Suppl 4**, S23-33.
- Pountos, I. and Giannoudis, P.V. (2005) Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* **36 Suppl 3**, S8-S12.
- Prockop, D.J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y)* **276**, 71-74.
- Puglisi, M.A., Giuliani, L. and Fierabracci, A. (2008) Identification and characterization of a novel expandable adult stem/progenitor cell population in the human exocrine pancreas. *J Endocrinol Invest* **31**, 563-572.
- Radcliffe, C.H. and Fortier, L.A. (2007) Defining a molecular marker profile for equine mesenchymal stem cells. In: *2007 ACVS Veterinary Symposium: The surgical summit*, Chicago, Illinois.
- Ramasamy, R., Tong, C.K., Seow, H.F., Vidyadaran, S. and Dazzi, F. (2008) The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* **251**, 131-136.
- Reed, S.A. and Johnson, S.E. (2008) Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *Journal of cellular physiology* **215**, 329-336.

- Reef, V., Genovese, R.L. and Davis, W. (1997) Initial long-term results of horses with superficial digital flexor tendonitis treated with intra-lesional β -aminopropionitrile-fumarate. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners* **43**, 301.
- Rees, J.D., Wilson, A.M. and Wolman, R.L. (2006) Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford, England)* **45**, 508-521.
- Reiners, S.R., Jann, H.W., Stein, L.E., Good, J.K. and Claypool, P.L. (2002) An evaluation of two autologous tendon grafting techniques in ponies. *Vet Surg* **31**, 155-166.
- Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D. and Smith, R.K. (2007) Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in biotechnology* **25**, 409-416.
- Ringe, J., Kaps, C., Burmester, G.R. and Sittinger, M. (2002) Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Die Naturwissenschaften* **89**, 338-351.
- Rombouts, W.J. and Ploemacher, R.E. (2003) Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**, 160-170.
- Roobrouck, V.D., Ulloa-Montoya, F. and Verfaillie, C.M. (2008) Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* **314**, 1937-1944.
- Rooney, J. and Genovese, R.L. (1981) A survey and analysis of bowed tendon in thoroughbred racehorses. *Journal of Equine Veterinary Science* **2**.
- Rosenbrock, A., Jacobi, R., Jaugstetter, H. and Brehm, W. (2004) Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses - A clinical case control study. In: *12th ESVOT Congress*, Eds: A. Vezzoni and M. Schramme, Munich.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M.C., de la Fuente, R., Cigudosa, J.C., Lloyd, A.C. and Bernad, A. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* **65**, 3035-3039.
- Saini, N.S., Mirakhur, K.K., Singh, M. and Roy, K.S. (1998) Homologous plasma-stored tendon grafting in equids--gross and histomorphological observations. *Research in veterinary science* **64**, 85-90.
- Schinkothe, T., Bloch, W. and Schmidt, A. (2008) In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **17**, 199-206.
- Schnabel, L.V., Lynch, M.E., van der Meulen, M.C., Yeager, A.E., Kornatowski, M.A. and Nixon, A.J. (2009) Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*.

- Schramme, M., Little, D., Linder, K. and Pease, T. (2006) Characterization of a new surgical model of tendonitis of the superficial digital flexor tendon in horses.
- Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **28**, 766-772.
- Sendzik, J., Shakibaei, M., Schafer-Korting, M. and Stahlmann, R. (2005) Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology* **212**, 24-36.
- Shalabi, A. (2004) Magnetic resonance imaging in chronic Achilles tendinopathy. *Acta radiologica*, 1-45.
- Sharma, P. and Maffulli, N. (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* **87**, 187-202.
- Sharma, P. and Maffulli, N. (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **6**, 181-190.
- Shih, D.T., Lee, D.C., Chen, S.C., Tsai, R.Y., Huang, C.T., Tsai, C.C., Shen, E.Y. and Chiu, W.T. (2005) Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 1012-1020.
- Silver, I.A., Brown, P.N., Goodship, A.E., Lanyon, L.E., McCullagh, K.G., Perry, G.C. and Williams, I.F. (1983) A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl*, 1-43.
- Smith, R.K. (2007) The use of bone marrow-derived stem cells in tendon injury. In: *Proceedings 2007 ACVS Veterinary Symposium: The surgical Summit 2007*, Orlando. pp 154-156.
- Smith, R.K. (2008a) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* **30**, 1752-1758.
- Smith, R.K. (2008b) Use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to enhance tendon and ligament healing. In: *Proceedings 2008 ACVS Veterinary Symposium: The surgical Summit 2008*, San Diego, California. pp 172-176.
- Smith, R.K., Korda, M., Blunn, G.W. and Goodship, A.E. (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal* **35**, 99-102.
- Smith, R.K. and Webbon, P.M. (1996) The physiology of normal tendon and ligament. In: *Proceedings of the Dubai Equine International Symposium*, Eds: N.W. Rantanen and M.L. Hauser. pp 55-81.

- Son, B.R., Marquez-Curtis, L.A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A.R., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z. and Janowska-Wieczorek, A. (2006) Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 1254-1264.
- Song, L. and Tuan, R.S. (2004) Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* **18**, 980-982.
- Sullins, K.E. (2002) The Tarsus. In: *Adams' lameness in Horses*, 5th edn., Ed: T.S. Stashak, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 930-987.
- Sundin, M., Orvell, C., Rasmusson, I., Sundberg, B., Ringden, O. and Le Blanc, K. (2006) Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant* **37**, 1051-1059.
- Taylor, S.E., Smith, R.K. and Clegg, P.D. (2007) Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine veterinary journal* **39**, 172-180.
- Thomopoulos, S., Harwood, F.L., Silva, M.J., Amiel, D. and Gelberman, R.H. (2005) Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. *The Journal of hand surgery* **30**, 441-447.
- Tokalov, S.V., Gruner, S., Schindler, S., Wolf, G., Baumann, M. and Abolmaali, N. (2007) Age-related changes in the frequency of mesenchymal stem cells in the bone marrow of rats. *Stem Cells Dev* **16**, 439-446.
- Trubiani, O., Di Primio, R., Traini, T., Pizzicannella, J., Scarano, A., Piattelli, A. and Caputi, S. (2005) Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**, 213-221.
- Tuan, R.S., Boland, G. and Tuli, R. (2003) Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy* **5**, 32-45.
- Tung, J.W., Parks, D.R., Moore, W.A. and Herzenberg, L.A. (2004) New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol* **110**, 277-283.
- Tyndall, A., Walker, U.A., Cope, A., Dazzi, F., De Bari, C., Fibbe, W., Guiducci, S., Jones, S., Jorgensen, C., Le Blanc, K., Luyten, F., McGonagle, D., Martin, I., Bocelli-Tyndall, C., Pennesi, G., Pistoia, V., Pitzalis, C., Uccelli, A., Wulffraat, N. and Feldmann, M. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis research & therapy* **9**, 301.

- Valdes-Vazquez, M.A., McClure, J.R., Oliver, J.L., 3rd, Ramirez, S., Seahorn, T.L. and Haynes, P.F. (1996) Evaluation of an autologous tendon graft repair method for gap healing of the deep digital flexor tendon in horses. *Vet Surg* **25**, 342-350.
- van der Laan, L.J., Lockey, C., Griffeth, B.C., Frasier, F.S., Wilson, C.A., Onions, D.E., Hering, B.J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B.E. and Salomon, D.R. (2000) Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* **407**, 90-94.
- Vannier, J.P., Monconduit, M. and Piguet, H. (1980) [Comparison between 2 density gradients for separation of CFU]. *Biomedicine* **33**, 236-239.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Johnson, J.R., Lopez, M.J., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2006) Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* **35**, 601-610.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* **36**, 613-622.
- Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M. and Gimble, J.M. (2008) Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* **37**, 713-724.
- Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C. and Mariani, P. (2009) Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* **10**, 29.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V. and Ho, A.D. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* **3**, e2213.
- Wang, M.X., Wei, A., Yuan, J., Clippe, A., Bernard, A., Knoops, B. and Murrell, G.A. (2001) Antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 is upregulated in degenerative human tendon. *Biochemical and biophysical research communications* **284**, 667-673.
- Wang, Y., Huso, D.L., Harrington, J., Kellner, J., Jeong, D.K., Turney, J. and McNiece, I.K. (2005) Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* **7**, 509-519.
- Watkins, J.P., Auer, J.A., Gay, S. and Morgan, S.J. (1985) Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *American journal of veterinary research* **46**, 2091-2096.

- Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B. and Hows, J.M. (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* **121**, 368-374.
- Wilke, M.M., Nydam, D.V. and Nixon, A.J. (2007) Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* **25**, 913-925.
- Williams, I.F., Heaton, A. and McCullagh, K.G. (1980) Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Research in veterinary science* **28**, 302-310.
- Williams, I.F., McCullagh, K.G., Goodship, A.E. and Silver, I.A. (1984) Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Research in veterinary science* **36**, 326-338.
- Wilmink, J., Wilson, A.M. and Goodship, A.E. (1992) Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Research in veterinary science* **53**, 354-359.
- Woo, S.L., Debski, R.E., Zeminski, J., Abramowitch, S.D., Saw, S.S. and Fenwick, J.A. (2000) Injury and repair of ligaments and tendons. *Annual review of biomedical engineering* **2**, 83-118.
- Woo, S.L., Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J.A., Papageorgiou, C.D. and Wang, J.H. (1999a) Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clinical orthopaedics and related research*, S312-323.
- Woo, S.L., Manson, T.T. and T.M, V. (1999b) Mechanical testing of ligaments and tendons. In: *Animal models in orthopaedic research*, Eds: Y.H. An and F. R.J, CRC Press, Boca Raton. pp 175-193.
- Yamamoto, E., Hata, D., Kobayashi, A., Ueda, H., Tangkawattana, P., Oikawa, M. and Takehana, K. (2002) Effect of beta-aminopropionitrile and hyaluronic acid on repair of collagenase-induced injury of the rabbit Achilles tendon. *Journal of comparative pathology* **126**, 161-170.
- Yokoo, S., Yamagami, S., Shimada, T., Usui, T., Sato, T.A., Amano, S., Araie, M. and Hamuro, J. (2008) A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using non-tissue culture dishes. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 1743-1748.
- Yoon, J.H. and Halper, J. (2005) Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **5**, 22-34.
- Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L. and Fink, D.J. (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* **16**, 406-413.

- Yovich, J.V., Sawdon, H., Booth, T.M. and Robertson, I.D. (1995) Correlation of ultrasonographic findings and long term outcome in racehorses with superficial digital flexor tendon injury. *Australian Equine Veterinarian* **13**.
- Zhang, A.Y. and Chang, J. (2003) Tissue engineering of flexor tendons. *Clin Plast Surg* **30**, 565-572.